

UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE
VON HEPATITIS B VIRUS
BEI DER ENTSTEHUNG
VON HEPATOZELLULÄREN
KARZINOMEN AM TIERMODELL
MARMOTA MONAX

Tarik Möröy

UNTERSUCHUNGEN ZUR ROLLE VON HEPATITIS B VIRUS
BEI DER ENTSTEHUNG VON HEPATOZELLULAREN KARZINOMEN
AM TIERMODELL MARMOTA MONAX

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Tarik Möröy
aus Benediktbeuern

München, 1987

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Dr. Peter-Hans Hofschneider
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Guido Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 21. Juli 1987

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde von Herrn Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie, angeregt und betreut. Der experimentelle Teil der Arbeit wurde in der Abteilung von Herrn Prof. Dr. P. Tiollais am Institut Pasteur durchgeführt. Herrn Prof. Dr. Dr. P.H. Hofschneider möchte ich für die Förderung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. P. Tiollais für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Experimente danken.

Herrn Prof. Dr. G. Hartmann danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor der Fakultät.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Dr. J. Etienne und Dr. M.A. Buendia für ihre Anteilnahme, Kritik und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für viele nützliche Hinweise sei an dieser Stelle Dr. J. Weissenbach, Dr. S. Wain-Hobson, Dr. C. Pourcel und Dr. P. Sonigo gedankt.

Frau L.M. Da danke ich für ihre Hilfe bei der Erstellung des Manuskripts.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. ZUSAMMENFASSUNG	1
B. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	5
1. Hepatitis B Virus	6
1.1. Aufbau und genetische Organisation	6
1.2. Transkription und Replikation	9
1.3. Die Familie der Hepadna-Viren	10
1.4. Hepatitis B Virus und hepatozelluläres Karzinom	11
2. Molekulare Biologie der Tumorentstehung	14
2.1. Onkogene und Retroviren	15
2.2. Das c-myc Proto-Onkogen	18
3. Problemstellung	21
C. ERGEBNISSE	22
1. Proto-Onkogen Aktivierung in Woodchuck HCCs	22
1.1. Überexpression Onkogen spezifischer Transkripte in HCC Gewebeproben WHV-infizierter Woodchucks	22
1.2. Analyse polyadenylierter RNA aus W93, W74 und W64 Leber	24
1.3. Somatische Rekombination des c-myc Onkogens in W93, W74 und W64 HCC	29
2. Charakterisierung der Rekombination des c-myc Onkogens in W64 HCC	36
2.1. Das normale c-myc Allel	36

2.2.	Das rearrangierte c-myc Allel	41
2.3.	Das mit c-myc rekombinierte Partnerallel	45
2.4.	Die Region des Bruchpunktes	48
2.5.	Versuche zur Identifizierung der mit c-myc rekombinierten Partnersequenz	51
3.	WHV Status der untersuchten Gewebeproben	59
3.1.	Transkription und Replikation von WHV	59
3.2.	Integrierte WHV Sequenzen	66
3.2.1.	W64 HCC	66
3.2.2.	W74 und W93 HCC	70
D.	DISKUSSION	73
E.	MATERIAL UND METHODEN	85
1.	Material	85
1.1.	Chemikalien	85
1.2.	Enzyme	86
1.3.	Radiochemikalien	87
1.4.	Sonstige Materialien	87
1.5.	Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide	88
1.6.	Tiere, Gewebeproben	88
1.7.	Medien	89
1.8.	Allgemein verwendete Puffer und Reagenzien	89
2.	Methoden	91
2.1.	DNA Isolierung	91

2.1.1.	Isolierung chromosomaler DNA	91
2.1.2.	Schnellpräparation von Plasmid DNA	91
2.1.3.	Präparative Isolierung von Lambda DNA	92
2.2.	RNA Isolierung	93
2.2.1.	Isolierung totaler zellulärer RNA	93
2.2.2.	Anreicherung der poly-A ⁺ Fraktion	93
2.3.	Verdau mit Restriktionsenzymen	94
2.4.	Agarosegelelektrophorese	94
2.4.1.	Gelelektrophorese von RNA	95
2.4.2.	Elektroelution von DNA Fragmenten	96
2.5.	Nicktranslation	96
2.6.	DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierungsbedingungen ("Southern-Blot")	97
2.7.	RNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierungsbedingungen ("Northern-Blot")	98
2.8.	Entfernung der radioaktiv markierten DNA von Nylonmembranen	99
2.9.	Plaque Test nach Benton und Davis	99
2.10.	Konstruktion einer "Genbibliothek" in Lambda Phagen	100
2.10.1.	Theorie	100
2.10.2.	Präparation des Vektors Lambda L47.1	102
2.10.3.	Präparation der Sau3A Fragmente	103
2.10.4.	Ligation	104
2.10.5.	Verpackung und Ausplattieren	104
2.11.	Klonierung in Plasmiden	106
2.11.1.	Ligierung	106
2.11.2.	Transformaton von <u>E.coli</u>	106

2.12.	Sequenzierung von DNA Fragmenten	107
2.12.1.	Klonierung in M13 mp8	107
2.12.2.	Präparation von Einzelstrang M13 Phagen DNA	108
2.12.3.	"Annealing" des Standard Primers und "Sanger"	
	Reaktionen	109
2.12.4.	Sequenzanalyse	112
3.	Als Proben verwendete DNA Fragmente	112
F.	ANHANG	114
G.	ABKÜRZUNGEN	115
H.	LITERATUR	117
I.	LEBENS LAUF	125

A. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgrund epidemiologischer Daten und Experimenten an Tiermodellen gilt heute ein kausaler Zusammenhang zwischen einer chronischen Infektion mit Hepatitis B Virus und der Ausbildung hepatozellulärer Karzinome (HCC) als sicher. Beispielsweise entwickeln nahezu alle experimentell mit Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) infizierten Woodchucks (Marmota monax) nach einer Latenzzeit von ein bis drei Jahren Leberkarzinome. Als diese Dissertation begonnen wurde, hatten bereits durchgeführte Untersuchungen an den ins Genom tumoraler Leberzellen integrierten viralen Sequenzen keine weiteren Hinweise ergeben, welcher molekulare Mechanismus für die Virus induzierte Leberkarzinogenese verantwortlich sein könnte. Versuche, durch Transfektion von "NIH 3T3" Mausfibroblasten mit DNA aus tumoralen Hepatozyten ein aktiviertes Onkogen zu isolieren, waren ebenfalls erfolglos geblieben.

Der experimentelle Ansatz dieser Arbeit stellt einen zur "NIH 3T3" Transfektionsmethode alternativen Weg dar, eventuelle Onkogenaktivierungen in Lebertumorgewebe aufzuspüren und sie mit der viralen Infektion in Zusammenhang zu bringen: Da sich die Aktivierung nukleärer Onkogene oft durch eine Überexpression bemerkbar macht, wurde mit Hilfe von RNA-Transfermethoden eine Reihe von Tumorgewebeproben chronisch WHV-infizierter Woodchucks , auf ein erhöhtes Expressionsniveau dieser Gene hin untersucht.

In drei von neun Fällen wurde eine Überexpression des Proto-Onkogens c-myc im Tumorteil, bezogen auf den nichttumoralen Teil der Gewebeprobe, beobachtet. Diese drei Fälle wurden in der vorliegenden Arbeit näher

untersucht. In HCC Gewebe von Woodchuck Nr. 64 (W64 HCC) wurde eine um 300 Nukleotide verkürzte, und um den Faktor 50 überexprimierte c-myc mRNA, sowie zwei längere, ebenfalls c-myc spezifische Transkripte von 4,7 und 5,8 kb gefunden. W93 HCC zeigte c-myc mRNAs zwischen 2,3 und 2,5 kb, deren Expressionsniveau etwa um das 10 fache über dem nichttumoralen Leber lag. W74 HCC Zellen produzierten ein 5 fach überexprimiertes c-myc Transkript von 5,6 kb Länge. Eine Southern Analyse der zellulären DNA dieser drei HCC Gewebeproben zeigte -neben integrierten Sequenzen des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV) - Rearrangements des c-myc Locus. In allen drei Fällen hatten sich die Rearrangements ausserhalb der kodierenden Region des c-myc Gens ereignet. Diese Situation erinnert stark an die in Burkitt Lymphomen und Plasmacytomen der Maus vorgefundenen Rekombinationen des c-myc Gens. Zur genaueren Analyse wurde das rearrangierte c-myc Allel aus W64 HCC mit Hilfe molekularer Klonierung isoliert, mit mehreren Restriktionsenzymen kartiert und teilweise sequenziert. Das c-myc Gen hatte sich mit einer nichtrepetitiven Region der zellulären DNA rekombiniert, die bis zu 5 kb 5' der Rekombinationstelle keine WHV Sequenzen enthielt. Eine direkte Rolle des Virus bei der c-myc Aktivierung durch Insertion 5' der kodierenden Region, in Analogie zu der durch Avian Leukosis Virus verursachten c-myc Aktivierung in bursalen Lymphomen bei Vögeln, ist für diesen Fall ausgeschlossen. Die genaue Lokalisierung des Bruchpunktes im ersten c-myc Intron 506 bp 5' des SacI Fragmentes, welches das zweite Exon enthält, konnte durch Vergleich der Sequenz des rearrangierten Allels mit der des Partnerallels und des normalen Woodchuck c-myc Gens ermittelt werden. Die bisher in der Literatur beschriebenen, mit c-myc rekombinierten DNA Regionen waren

entweder Immunglobulin- oder T-Zell Rezeptorgene. Ein Abgleich der in W64 HCC gefundenen Partnersequenz mit der "Los Alamos" Datenbank zeigte jedoch weder mit Immunglobulinen noch T-Zell Rezeptorgen noch mit sonstigen bekannten Sequenzen eine signifikante Homologie. Northern Analysen zeigten aber, dass diese mit c-myc rekombinierten Sequenzen Teil eines zellulären Gens sein müssen, das in Form einer 4,6 kb mRNA wahrscheinlich leberspezifisch exprimiert wird.

Zelluläre DNA aus W64, W93 und W74 HCC enthielten integrierte WHV-Sequenzen. In allen drei Tumorgewebeproben wurden WHV-spezifische mRNA Moleküle gefunden, die wahrscheinlich Transkripte der integrierten viralen DNA, oder Kotranskripte viraler und benachbarter zellulärer DNA darstellen.

Während in W64 HCC die Rekombination des c-myc Gens ohne direkte Mitwirkung von WHV stattgefunden hat, deutet ein Vergleich der Southern Analysen von W74 HCC und W93 HCC mit myc Exon 1 und WHV als Probe auf eine Integration des Virus in der Nähe des c-myc Gens hin. In diesen beiden Fällen ist die c-myc Aktivierung also einer direkten Einwirkung des Virus zuzuschreiben.

In der Literatur sind Aktivierungen des c-myc Proto-Onkogens in einer Vielzahl von Tumoren beschrieben worden, wobei entweder die Amplifikation des c-myc enthaltenden Chromosomenabschnittes oder ein Rearrangement mit dem Immunglobulin- oder T-Zell Rezeptor Locus oder retrovirale Insertion 3' oder 5' des c-myc Gens für seine Aktivierung verantwortlich waren.

Adams et al. (1985) und Sinn et al. (1987) beschreiben die Ausbildung von Tumoren in Mäusen, die aktivierte ras oder c-myc Gene als Transgene enthalten. Da diese Tumoren monoklonalen Ursprungs waren, müssen zusätzliche somatische Ereignisse in der Zelle stattgefunden haben, die in Kooperation mit den aktivierten Proto-Onkogenen die Zelltransformation herbeigeführt haben. Diese Daten zeigen, dass die Aktivierung des c-myc Gens im Prozess der Onkogenese für eine Reihe bestimmter Tumoren eine notwendige aber nicht ausreichende Etappe darstellt.

Die mit Hepatitis Virus Infektion assoziierte Entstehung von Leberkarzinomen ist mit Sicherheit auf verschiedene molekulare Mechanismen zurückzuführen. Der für die hier beschriebenen Fälle W93, W74 und W64 verantwortliche Mechanismus beinhaltet jedoch neben noch unbekannten Ereignissen die Aktivierung des c-myc Proto-Onkogens durch direkte oder indirekte Einwirkung von Hepatitis Virus.

B. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Unter den verschiedenen Typen von Leberentzündungen viralen Ursprungs ist die "B-Hepatitis" eine besonders gravierende Form. Einmal wegen der Gefahr einer Persistenz des Hepatitis B Virus (HBV) im Organismus und der damit verbundenen möglichen Ausbildung einer Leberzirrhose oder eines hepatozellulären Karzinoms (HCC), aber auch wegen ihrer ausserordentlich weiten Verbreitung : In Südostasien und im tropischen Afrika sind 10% der Bevölkerung chronische Virusträger. Chronische Hepatitis und Leberzirrhose sind dort eine der häufigsten Todesursachen.

Eine HBV Infektion verläuft in 80% aller Fälle ohne ausgeprägte Krankheitssymptome. In 20% der Fälle führen nach einer Inkubationszeit von 1-2 Monaten akute, klinisch manifeste Infektionen zu einer schweren Leberentzündung die nach einigen Monaten wieder abklingt. In 1-5% der Fälle ist die Infektion fulminant, und endet häufig mit dem raschen Tod des Patienten.

Bei etwa 5-10% aller HBV-infizierten Patienten bleibt das virale Oberflächenantigen (HBsAg) über längere Zeit, oft über Jahrzehnte, im Serum nachweisbar. Zu dieser Personengruppe von "chronischen Trägern" des HBsAg gehören weltweit ca. 200 Mio Menschen. Ein grosser Teil - die sogenannten "gesunden" chronischen Virusträger - zeigt keine Anzeichen von Leberentzündung. Bei einem kleinen Teil der Träger besteht jedoch gleichzeitig eine chronische Hepatitis, die morphologisch in "chronisch-persistierende" Hepatitis und "chronisch-aggressive" Hepatitis unterteilt

wird. Solche chronischen Infektionen führen häufig nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren zur Ausbidung von hepatozellulären Karzinomen.

Epidemiologische Daten zeigen einen deutlichen Zusammenhang zwischen chronischer HBV-Infektion und der Entstehung von HCC (Beasley et al., 1984). Der Klärung der Frage welcher molekulare Mechanismus für die Transformation von gesunden Leberzellen in Krebszellen verantwortlich ist und welche Rolle HBV dabei spielt, kommt daher grosse Bedeutung zu.

1. HEPATITIS B VIRUS

1.1. Aufbau und genetische Organisation

Im Serum von chronisch infizierten Patienten finden sich zwei Arten von Viruspartikeln: stäbchen- und kugelförmige Partikel, die leere Virushüllen darstellen, mit einem radialen Durchmesser von 22 nm, und gelegentlich komplette Virionen - die infektiösen "Dane-Partikel" - mit einem Durchmesser von 42 nm (Dane et al., 1970). Das Virion besteht aus einer Hülle und einem Nukleokapsid, welches ein zirkuläres DNA Molekül, eine DNA Polymerase, eine Proteinkinaseaktivität und ein an DNA gebundenes Protein enthält. Die Virushülle trägt das Hepatitis B Oberflächenantigen, HBsAg, das Nukleokapsid das Hepatitis B "Core" Antigen, HBcAg. Befinden sich Virionen im Blut, wird die Anwesenheit eines weiteren löslichen Antigens im Serum festgestellt: das e Antigen, HBeAg. HBsAg besitzt eine Antigen Determinante a und vier Subtypendeterminanten d, y, w und r. Die vier möglichen Subtypen adw, adr, ayw und ayr sind weltweit nicht gleichmässig verteilt. Zum Beispiel kommen y Determinanten in

Südostasien und r Determinanten in Afrika nicht vor.

Das HBV-Genom hat eine charakteristische Struktur : Es ist ein zirkuläres, teilweise doppelsträngiges DNA Molekül mit einer Einzelstrangregion von variabler Länge (siehe Abb. 1). Der lange oder L(-) Strang hat die konstante Länge von 3200 bp. Der kurze oder S(+) Strang variiert in der Länge zwischen 50 und 100% des L(-) Strangs. Die 5' Enden des L(-) und S(+) Stranges sind an der Position 1601 bzw 1826 fixiert (Will et al., 1987), während das 3' Ende des S(+) Stranges variabel ist. Die zirkuläre Struktur des Genomes wird durch Basenpaarung der beiden 5' Enden aufrechterhalten (Abb. 1). Diese Region wird von einer 11 bp langen, direkt wiederholten Sequenz ("direct Repeats", DR1 bzw. DR2, siehe Abb. 1) flankiert. Die beiden Kopien dieser Sequenz beginnen bei Position 1824 bzw. 1590 (Tiollais et al., 1985).

Die Transkripte des L(-) Strangs konservieren in allen bisher sequenzierten Subtypen vier offene Leserahmen. Da dem S(+) Strang kein offener Leserahmen zugeordnet werden konnte, trägt der L(-) Strang die gesamte Kapazität des Virus zur Proteinkodierung. Die vier Leserahmen wurden mit S, C, P und X bezeichnet. Die S Region kodiert für die Hüllproteine des Virus und ist unterteilt in das S-Gen, die pre-S1 und die pre-S2 Region. Die C Region ist unterteilt in das C-Gen und die pre-C Region. Das C-Gen enkodiert das "Core" Protein P22^C und das HBeAg, ein Proteolyseprodukt des "Core" Proteins. Die P Region kodiert für die virale DNA Polymerase, ein Enzym, das wahrscheinlich die Aktivitäten einer reversen Transkriptase, einer DNA abhängigen DNA Polymerase und einer RNase

auf sich vereinigt. Die X Region kann für ein Polypeptid mit 154 Aminosäuren kodieren, dessen Auftreten in der infizierten Leberzelle aber noch nicht formal nachgewiesen wurde, und über dessen Funktion deshalb keine Daten vorliegen. Man nimmt jedoch an, dass es sich um das Gen für einen Transaktivator handelt (P.Zahm, M.Wollersheim, persönliche Mitteilung).

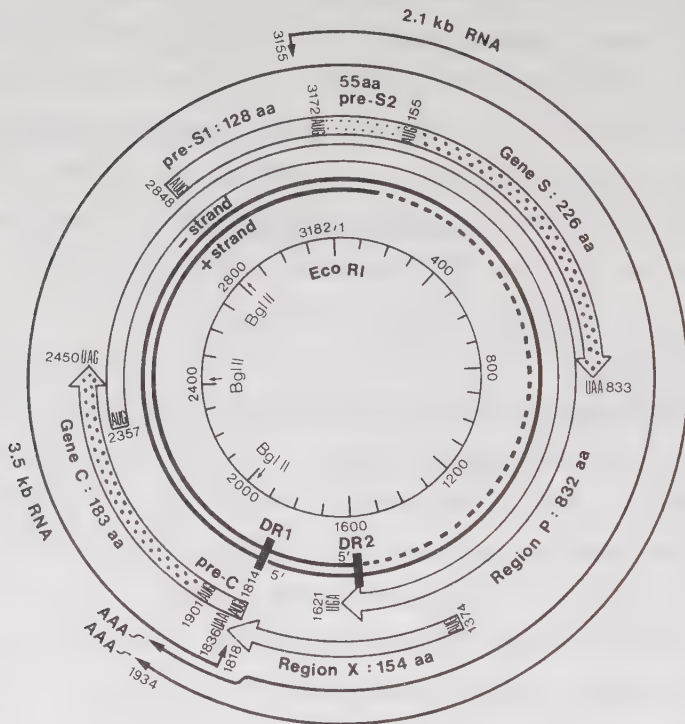


Abb.1. Struktur und genetische Organisation des HBV Genoms :
Breite Pfeile geben die offenen Leserahmen des L(-) Strangs an. Die Anzahl der Aminosäuren für jeden kodierenden Abschnitt ist angegeben. Die dünnen Pfeile stellen HBV Transkripte mit ihren jeweiligen 5' und 3' Enden dar. Die partielle Restriktionskarte und die Numerierung der Nukleotide, die im inneren Kreis angegeben sind entsprechen dem Subtyp ayw₃. Die beiden "direct repeats", DR1 und DR2, sind als schwarze Rechtecke repräsentiert. Die Positionen der Start und Stoppkodons aller Leserahmen sind ebenfalls angegeben (aus Tiollais et al., 1985).

1.2. Transkription und Replikation

Zwei Transkripte von 2,1 und 3,5 kb wurden in HBV infizierter Schimpansenleber charakterisiert (Cattaneo et al., 1984, Will et al., 1987). Beide mRNAs haben ein gemeinsames 3' Hydroxylende ; 20 bp nach den Polyadenylierungs Signal TATAAA in Position 1974. Das 5' Ende der 2,1 kb mRNA wurde 20 bp vor der pre-S2 Region lokalisiert. Dieses Transkript enthält somit die pre-S2 Region, das S-Gen und die X Region. Die 3,5 kb mRNA startet innerhalb der pre-C Region, bedeckt das ganze HBV Genom und enthält noch etwa 100 bp der C Region zusätzlich (siehe auch Abb.1.). Um dieses Transkript herzustellen, muss das Polyadenylierungssignal in Position 1974 einmal überlesen werden. Transfektionsexperimente mit klonierten HBV Fragmenten und HBV Polymeren haben gezeigt, dass das 2,1 kb Transkript die mRNA für das S Genprodukt, das 3,5 kb Transkript die mRNA für das "Core" Protein und wahrscheinlich für die DNA Polymerase darstellen (Pourcel et al., 1982, Gough, 1983). Alle bisherigen Resultate schliessen die Existenz gespleissster mRNA Moleküle aus. Welche der mRNA Moleküle für den pre-S1 Bereich und das X Proteine kodieren, ist noch ungeklärt.

Der Replikationsmechanismus von HBV, der von Summers und Mason (1982) für Duck Hepatitis Virus (DHV, siehe Kap. 1.3.) entdeckt und später für HBV bestätigt wurde, unterscheidet sich stark von dem anderer DNA Viren. Die oben beschriebene 3,5 kb mRNA wird von der virusenkodierten reversen Transkriptase als Replikationsvorlage benutzt, und daher auch als "Prägenom" bezeichnet. Hierin ähnelt HBV stark der Familie der Retroviren (zur Replikation siehe Seeger et al., 1986, Will et al., 1987).

1.3. Die Familie der Hepadna-Viren

HBV gehört zu einer Gruppe von Viren, die als "Hepadna-Viridae" bezeichnet wird (Robinson et al., 1981). Zu ihr zählen ebenfalls "Woodchuck Hepatitis Virus" (WHV, Summers et al., 1978), "Ground Squirrel Hepatitis Virus" (GSHV, Marion et al., 1980) und "Duck Hepatitis Virus" (DHV, Mason et al., 1980). Alle Viren sind hauptsächlich hepatotrop und führen zu akuten und persistierenden Infektionen.

Die Länge des partiell einzelsträngigen DNA Genoms variiert zwischen 3300 bp für WHV und GSHV und 3021 bp für DHV. Die Homologien der Nukleotidsequenzen mit HBV liegen bei 70%, 55% und 40% für WHV, GSHV bzw. DHV. WHV und GSHV sind mit über 80% Nukleotidsequenzhomologie und einer fast identischen genetischen Organisation sehr eng miteinander verwandt. Bis auf die pre-S1 Nukleotidsequenz, die Insertionen und Deletionen aufweist, ähnelt die Organisation des WHV-bzw. GSHV-Genoms stark der von HBV. DHV weicht in seinem genetischen Programm etwas von den restlichen Mitgliedern der Hepadna Familie ab : Sein L(-) Strang besitzt keine Sequenzen für die X Region. Alle drei Tierspezies konnten experimentell infiziert werden und der Krankheitsverlauf bis hin zur Entwicklung von Leberkarzinomen verfolgt werden. (wiedergegeben in Popper et al., 1987).

1.4. Hepatitis B Virus und hepatozelluläres Karzinom

Epidemiologische Daten zeigen eine weltweite geographische Korrelation zwischen der Verbreitung chronischer HBsAg Träger und dem Auftreten von hepatozellulären Karzinomen (HCC). Eine detaillierte Studie wurde von P. Beasley et al. (1984) in Taiwan an über 3.000 chronischen HBsAg Trägern und etwa 20.000 HBsAg negativen Personen (Kontrollgruppe) mit folgenden Resultaten durchgeführt.

- Das relative Risiko für die Ausbildung von HCC ist für chronische HBsAg Träger etwa 200 mal höher als für HBsAg negativen Personen. (Einer der höchsten bisher gefundenen Werte für eine Risikogruppe, eine bestimmte maligne Tumorart auszubilden).
- 40% der untersuchten HBsAg Träger, aber nur 2% der Personen aus der Kontrollgruppe starben innerhalb von 6 Jahren an HCC.
- 90% der HBsAg negativen Personen weisen anti-HBs und/oder anti-HBc Antikörper auf.

Das Vorkommen von HCC steht deshalb eindeutig mit dem chronischen HBsAg Trägerstatus und nicht mit einer HBV Infektion per se in Verbindung.

Ein Teil der HBsAg negativen Personen mit Leberkarzinomen, oft Alkoholiker oder Patienten mit Hämochromatose, ist positiv für HBV DNA in der Leber. Es bleibt ungeklärt, ob bei HBsAg negativen Personen ein

anderes etiologisches Agens für die Entwicklung von Lebertumoren verantwortlich ist, oder ob nur die Nachweisgrenze der Testmethode unterschritten wurde. (Bréchet, 1987).

Ein zweites Argument für HBV als Ursache der Lebertumorentstehung liefert das Woodchuck/WHV Tiermodell. Ein grosser Teil freilebend infizierter Tiere entwickelte unter Laborbedingungen hepatozelluläre Karzinome (J. Gerin, persönliche Mitteilung). H. Popper und Kollegen (1987) konnten zeigen, dass nahezu alle experimentell chronisch infizierten Tiere nach einer Latenzzeit von 17-36 Monaten HCC ausbilden.

Untersuchungen der DNA aus HCC-Zelllinien und Tumorgewebeproben von chronischen HBsAg Trägern bzw. chronisch infizierten Woodchucks zeigten in beinahe allen Fällen ins Wirtsgenom integrierte HBV bzw. WHV Sequenzen (Chakraborty et al., 1980, Bréchet et al., 1980, Edman et al., 1980, Ogston et al., 1982, Shafritz et al., 1981), aber selten frei replizierende virale DNA. Die Zahl der Integrationsstellen schwankte dabei zwischen 1 und 12. Im nichttumoralen Teil der infizierten Leber wurden oft intermediäre replikative Formen viraler DNA beobachtet. Chronisch infizierte und zirrhotische Gewebe können jedoch auch integrierte virale Sequenzen enthalten (wiedergegeben in Tiollais et al., 1985). In frühen Stadien des Tumorwachstums treten gelegentlich integrierte und freie Formen von HBV bzw WHV DNA gleichzeitig auf. In der Regel findet in den stark entdifferenzierten Hepatozyten eines Tumors im fortgeschrittenen Stadium weder Virusreplikation noch Expression viraler Gene statt. Dieser Sachverhalt kann dadurch erklärt

werden, dass Zellen ohne virale Replikation oder Expression einen Selektionsvorteil während des Tumorwachstums besitzen.

HBcAg wird als Ziel der cytotoxischen Immunantwort angesehen. Trifft dies zu, so würden diejenigen Hepatozyten, die kein HBcAg exprimieren, also keine sich replizierenden Viren, sondern stumme integrierte Sequenzen enthalten, einen Selektionsvorteil gegenüber chronisch infizierten Zellen erfahren (wiedergegeben bei Tiollais et al., 1985).

Die Struktur integrierter HBV bzw. WHV Sequenzen in HCC-Zelllinien und Tumorgewebeproben wurden durch molekulare Klonierung und Nukleotidsequenzierung aufgeklärt (Dejean et al., 1983, Koshy et al., 1983, Yaginuma et al., 1985, Ziemer et al., 1985) : Die verschiedenen rearrangierten Anordnungen der in zelluläre DNA integrierten genomischen und subgenomischen Fragmente liessen keinen Schluss auf eine spezifische Integrationsstelle hinsichtlich der Wirtschromosomen zu. Dejean und Mitarbeiter (1984) berichten jedoch von zwei unabhängigen humanen Tumorgewebeproben, in denen die Sequenzen DR1 bzw. DR2 (siehe Abb. 1) als virusspezifische Integrationstellen verwendet wurden . Es ist jedoch wahrscheinlich, dass spezifische und unspezifische Integrationsmechanismen koexistieren. Eine Konservierung bestimmter Regionen integrierter HBV oder WHV Sequenzen konnte nicht festgestellt werden. Transformationsexperimente mit klonierter HBV DNA oder den subklonierten integrierten Sequenzen einschliesslich flankierender zellulärer Regionen sowie mit zellulärer DNA aus HCC Gewebe waren erfolglos geblieben (M. Barbacid, A.F. von Loringhoven, D. Ganem, persönliche Mitteilung).

Es ist möglich, dass sich HBV oder WHV Integrationen zufällig ereignen, und sich sooft in verschiedenen Zellen wiederholen, bis eines dieser Ereignisse der betreffenden Zelle einen Wachstumsvorteil verschafft und sie so mit Hilfe anderer, noch unbekannter Mechanismen zur Stammzelle eines Tumors werden lässt.

Zwei molekulare Mechanismen der HBV induzierten Leberkarzinogenese wurden 1984, als diese Dissertation begonnen wurden, diskutiert :

- a) Insertion des HBV Genoms oder subgenomischer Fragmente in ein zelluläres Proto-Onkogen und die Aktivierung dieses Proto-Onkogens durch virale Promotoren, oder die Ausbildung von Fusionsproteinen zwischen HBV und Proto-Onkogen (direkte Rolle von HBV als Insertionsmutagen).
- b) Existenz eines noch unbekannten Proto-Onkogens, welches im HCC-Gewebe nach Art des c-ras Proto-Onkogens (siehe folgender Abschnitt 2) ohne eine direkte Mitwirkung des Virus aktiviert wurde.

2. MOLEKULARE BIOLOGIE DER TUMORENTSTEHUNG

Die Annahme, dass Mutationen der zellulären DNA für die Tumorenstehung verantwortlich sein könnten, gründet sich auf folgende Beobachtungen :

- Erbliche Prädisposition verschiedener Krebsarten.
- Vorkommen beschädigter Chromosomen in Krebszellen.

- Zunahme der Entstehung von Hautkrebs bei mangelhaft arbeitenden DNA-Reparaturmechanismen der Zelle.
- Hinweise für eine Rolle von mutagenen Substanzen bei der Karzinogenese.
- Entdeckung der Proto-Onkogene, die in aktivierter Form als Onkogene neoplastisches Wachstum mit verursachen können.

2.1. Onkogene und Retroviren

Onkogene wurden zuerst im Genom von akut transformierenden Retroviren gefunden und als leicht veränderte Gene zellulären Ursprungs erkannt. Diese Proto-Onkogene wurden wahrscheinlich im Verlauf der Evolution von Retroviren während des Replikationszyklus mit in ihr Genom eingebaut und durch verschiedene Mutationen zum Onkogen aktiviert. Die Erzeugung retroviraler Onkogene aus zellulären Proto-Onkogenen wird "Transduktion" genannt, obwohl dieser Term eigentlich den Gentransfer durch Virusinfektion von einer Zelle in eine andere beschreibt. Neben diesen zellulären Onkogenen existieren auch virale Onkogene wie das T Antigen des Polyoma Virus und des SV 40 Virus, oder die E1A und E1B Genprodukte von Adenovirus.

Über 40 virale und zelluläre Proto-Onkogene sind heute bekannt. Sie werden in ihrer aktivierten Form als Onkogene mit der Ausbildung oder Progression vieler verschiedener Tumoren in Verbindung gebracht. Nach der Lokalisierung ihrer Genprodukte werden sie in nukleäre, zytoplasmatische und plasmamembranäre Onkogene eingeteilt. c-myc, c-fos, c-myb, und E1A gehören z.B. zu den nukleären Onkogenen. Ihre

Genprodukte binden an die zelluläre DNA und beeinflussen wahrscheinlich Transkriptions- und Replikationsvorgänge. c-mil und c-mos sind zytoplasmatische Onkogene, c-erb-B, c-src und c-fms sind in der Plasmamembran lokalisiert. Ihre Genprodukte weisen Proteinkinaseaktivität auf. Andere wie etwa c-sis weisen starke Homologien zu Wachstumsfaktoren oder wie c-erb-B zu deren Rezeptoren auf. Die Proteine der ras Genfamilie - Ki-ras, Ha-ras, N-ras - sind ebenfalls mit der Plasmamembran assoziiert. Ihre physiologische Rolle ist die eines G-Proteins, also die Regulation der Adenylatcyclaseaktivität. Das ras Onkogen ist zwar noch in der Lage GTP wie ein funktionstüchtiges G-Protein zu binden, die Hydrolyse in GDP und Phosphat erfolgt aber um einen Faktor 10 langsamer.

Die Aktivierung der Proto-Onkogene zu Onkogenen kann über folgende Mechanismen erreicht werden :

- Insertionsmutagenese: Durch Integration ins Wirtsgenom plazieren Retroviren ihre Promoter - oder Enhancersequenzen an das 5' oder 3' Ende eines Proto-Onkogens, und beeinflussen seine Expression (z.B.: c-myc und Avian Leukosis Virus (ALV) in Bursa Lymphomen von Vögeln).
- Rearrangements zwischen kodierenden Abschnitten eines Proto-Onkogens und zellulären Sequenzen führen zur Deregulation seiner Expression, oder zur Entstehung anormaler Transkripte (z.B.: c-myc und dem Immunglobulin Locus in B-Zell Tumoren, oder c-abl in chronischer myelogenischer Leukämie mit dem bcr Locus).

- Die Amplifikation des DNA Abschnittes, in dem das Proto-Onkogen lokalisiert ist führt zur Überexpression (z.B. N-myc in Neuroblastomen, c-myc im "small cell lung carcinoma").
- Spontane oder durch Mutagene hervorgerufene Punktmutationen verändern die Struktur des Proto-Onkogen Produktes (z.B. c-ras in einer Vielzahl von Tumoren).

Man nimmt für das gut untersuchte c-myc Gen und eine Reihe anderer nukleäre Proto-Onkogene (c-ets, c-fos, c-myb, N-myc) an, dass der Aktivierung nicht eine Veränderung der Proteinstruktur, sondern eine Abkoppelung der kodierenden Sequenzen von ihren Regulationseinheiten und die Etablierung einer konstitutiven Expression zu Grunde liegt . Oft ist die mRNA Produktion nach einer solchen Onkogenaktivierung erhöht. Dagegen werden die Genprodukte einiger an der Plasmamembran lokalisierter und cytoplasmatischer Proto-Onkogene durch die Aktivierung in ihrer Architektur verändert. Der Fall des aktivierten c-ras Onkogens, in dem durch Punktmutation die enzymatische Aktivität des Proteins verändert wurde, liefert hierfür ein anschauliches Beispiel.

Die Aktivierung der ras Proto-Onkogene und von c-erb-B kann in einigen Fällen auch durch Überexpression erreicht werden, obwohl sie keine nukleären Proto-Onkogene sind.

(Alle Daten in diesem Kapitel wiedergegeben bei R. Weinberg, 1985, J.M. Bishop, 1985, 1987).

2.2. Das c-myc Proto-Onkogen

Mill-Hill-2 Virus (MH2) gehört zu einer Gruppe von Retroviren, die bei Vögeln eine bestimmte Art von Leukämie erzeugen. Alle Mitglieder dieser Retrovirengruppe enthalten die Sequenz v-myc, die auf das zelluläre Gen c-myc zurückzuführen ist. Während die Aktivierung des Proto-Onkogens c-myc mit der spontanen Ausbildung von Plasmacytomen und B-Zell Tumoren in Verbindung gebracht wird, verursachen die v-myc enthaltenden Retroviren in vitro die Transformation von Fibroblasten und Makrophagen von Hühnern, in vivo neben Leukämie auch Leber- und Nierenkarzinome (wiedergegeben bei Coll et al., 1983).

Das Proto-Onkogen c-myc enthält in 5,2 kb drei Exons und zwei Introns. Exon 2 und 3 besitzen die gesamte Kodierungskapazität für ein funktionelles c-myc Protein. Exon 1, das 5' der Exons 2 und 3 liegt, ist nicht kodierend, enthält aber den Promotor P2, der zusammen mit P1, der unmittelbar 5' des ersten Exons liegt, die Synthese der c-myc mRNA dirigiert. P2 dominiert in seiner Stärke über P1, sodass der grösste Teil der c-myc mRNA eine Länge von 2,3 kb aufweist. Nepveu und Marcu (1986) beschreiben eine Attenuator Region unmittelbar 3' des ersten Exons/Intron Übergangs, Remmers et al. (1986) berichten von einer "Dehancer" Sequenz 5' des ersten Exons. Da ferner im ersten Intron sogenannte kryptische Promotoren gefunden wurden (Stanton et al., 1983), die vor allem in durch Rearrangements im 1. Intron verkürzten c-myc Genen eine Rolle spielen, lässt sich dieses Proto-Onkogen eindeutig in zwei Abschnitte unterteilen: Exon 2 und 3 einerseits mit ihrer Proteinkodierungsfunktion, Exon 1 und seine 3' und 5' flankierenden Sequenzen andererseits, die die Transkription des Gens regulieren.

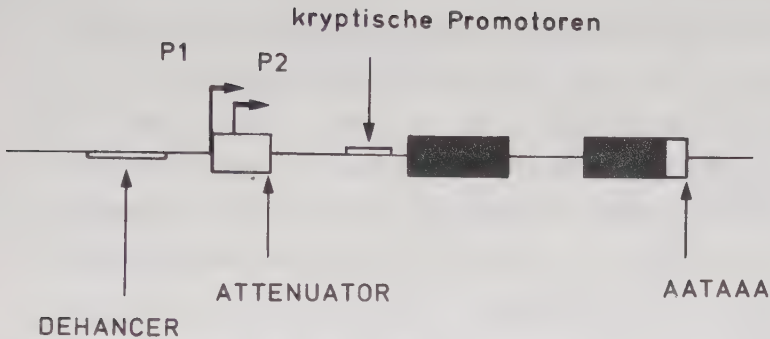


Abb.2.Schematische Darstellung des c-myc Gens:

Schwarze Rechtecke: kodierende Exons 2 und 3 ,offene Rechtecke : nichtkodierende Bereiche und Exon 1 , weitere Erklärungen siehe Text.

Die Lokalisierung des c-myc Proteins im Zellkern (Alitalo et al., 1983) deutet auf eine Funktion in Transkriptions- und Replikationsprozessen oder Spleissvorgängen hin. Die Expression von c-myc hängt von Differenzierungs- und Wachstumsprozessen der Zelle ab. Beispielsweise ist das Expressionsniveau in neonatalem und adultem Mausthymusgewebe gleich, in adultem Lebergewebe aber im Vergleich zu neonatalem um den Faktor 20 geringer (Zimmermann et al., 1986) (Expressionsniveau : Menge an spezifischen mRNA Molekülen im Gleichgewichtszustand). Induziert man Zellen in Kultur zur Differenzierung, so fällt das Expressionsniveau (Lachmann et al., 1984), provoziert man ruhende Zellen zu Wachstum und Zellteilung so steigt das Expressionsniveau des c-myc Gens (Makino et al., 1984). Diese Regulation der Expression ist in den Tumorgeweben in denen c-myc zum Onkogen aktiviert ist, aufgehoben: die Expression ist

konstitutiv.

Es wird allgemein angenommen, dass die Aktivierung von c-myc allein nur zur Immortalisierung von Zellen und nicht zur Ausprägung des tumoralen Phänotyps führt. Hierfür muss ein weiteres Ereignis in der Zelle stattfinden. Land und Mitarbeiter (1983) konnten zeigen, dass aktivierte c-myc und c-ras Gene in Kooperation primäre Rattenembryofibroblasten transformieren können. Sinn et al. (1987) setzten das virale v-Ha-ras Gen und das c-myc Proto-Onkogen, jeweils unter der Kontrolle desselben heterologen Promotors, verschiedenen Mäusen als Transgen ein. Die v-Ha-ras Träger entwickelten benigne Hyperplasien der Tränendrüse und maligne Tumoren der Brust- und der Speicheldrüse. Die Träger des aktivierten c-myc Proto-Onkogens entwickelten ebenfalls Brustdrüsentumore und Lymphome. All diese Tumoren waren monoklonal, d.h. aktivierte c-myc oder ras Gene sind zwar notwendig aber nicht ausreichend für eine Tumorentstehung. Ein oder mehrere somatische Ereignisse werden für eine vollständige Ausbildung eines Tumors zusätzlich benötigt. Die Kreuzung der beiden transgenischen Mausstämmen lieferte Tiere, die beide Onkogene exprimierten und die mit einer Häufigkeit Adenokarzinome und Lymphome entwickelten, die weit über dem additiven Effekt der beiden einzelnen aktivierten Onkogene lag.

Diese Befunde unterstreichen, dass die Onkogenese ein Prozess ist, der in mehreren Schritten abläuft, und die Aktivierung verschiedener Onkogene verlangt, die in einer synergistischen Art und Weise miteinander kooperieren müssen.

3. PROBLEMSTELLUNG

Am WHV/Woodchuck Tiermodell sollten im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragen geklärt werden :

- a) Ist eines der bekannten zellulären Proto-Onkogene in Leberkarzinomen von chronisch mit WHV infizierten Woodchucks aktiviert ?
- b) Wenn ja, über welchen molekularen Mechanismus hat seine Aktivierung stattgefunden, und welche Rolle spielte WHV dabei ?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende experimentelle Verfahren angewandt :

- a) Untersuchung von Tumor- und Nichttumorgewebeproben auf Überexpression verschiedener Onkogene mit Hilfe von RNA Transfermethoden.
- b) Isolierung und Charakterisierung eines aktivierten Proto-Onkogens mittels molekularer Klonierung.
- c) Charakterisierung des WHV Status der untersuchten Gewebeproben, mittels Northern und Southern Analyse, sowie molekularer Klonierung.

C. ERGEBNISSE

1. PROTO-ONKOGEN AKTIVIERUNG IN WOODCHUCK HCC

Die Existenz eines aktivierten Onkogens in Tumorzellen macht sich im Falle der nukleären Onkogene durch eine Überexpression seiner mRNA, oder durch die Neuarrangierung seiner genetischen Struktur bemerkbar. Eine Überexpression kann durch Northern Analyse der RNA aus den betreffenden Geweben oder Zelllinien leicht nachgewiesen werden. Punktmutationen die einige membranständige Proto-Onkogene aktivieren, sind nur durch differentielle Hybridisierungen mit verschiedenen Oligonukleotiden oder durch Untersuchung der jeweiligen Genprodukte mit Antikörpern, die nur die aktivierte Form erkennen, nachzuweisen. Die Proto-Onkogene c-ras und c-erb-B können jedoch, obwohl sie der plasmamembranären Gruppe angehören, ebenfalls durch Amplifikation und der damit einhergehenden Überexpression aktiviert werden (Weinberg, 1985). Die Aktivierung von c-erb-A, dem Gen für den Rezeptor der Thyroidhormone, könnte ebenfalls mit einer Überexpression einhergehen.

1.1. Überexpression onkogenspezifischer Transkripte in HCC-Gewebeproben WHV infizierter Woodchucks

Gesamt RNA aus HCC-Gewebeproben (T), aus nichttumoraler, chronisch

infizierter Leber (N), und aus verschiedenen Lebern gesunder Tiere wurde auf mehreren denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose Membranen übertragen und mit onkogenspezifischen, radioaktiv markierten DNA Fragmenten hybridisiert (In Zusammenarbeit mit Dr.M.A.Buendia). Während für die Proto-Onkogene c-myb, c-ets, c-erb-B, c-erb-A, Ha-ras, Ki-ras, N-ras, N-myc und c-fos ähnlich niedrige Transkriptionsniveaus (d.h. m-RNA Moleküle im Gleichgewichtszustand) nachgewiesen wurden, zeigten drei HCC-Gewebeproben von neun untersuchten ein deutlich erhöhtes Transkriptionsniveau für c-myc.

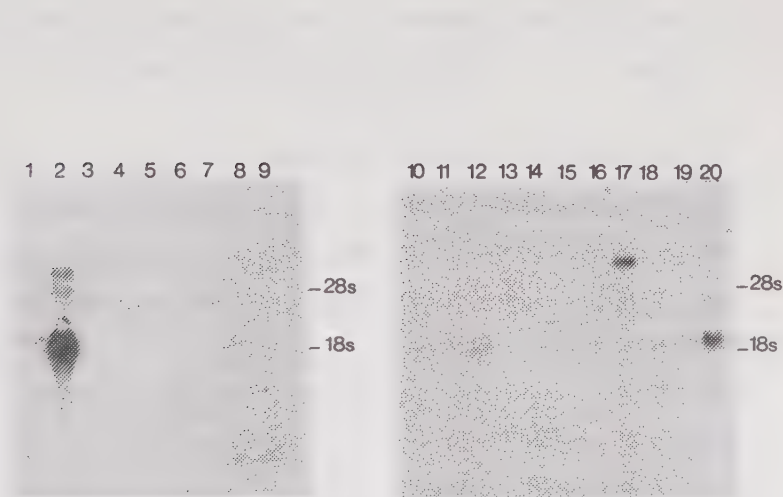


Abb.3. Northern Analyse von GesamtRNA aus Tumor und Nichttumor Gewebeproben sowie aus normalen Gewebeproben :

Aufgetragen wurden je 40 µg totaler RNA. Spur 1: W64N, 2: W64T, 3: W97T, 4: W98N, 5: W98T, 6: W101, 7: W20, 8: W81, 9: W120, 10: W43N, 11: W43T, 12: W44N, 13: W44T, 14: W418N, 15: W418T, 16: W74N, 17: W74T, 18: W94N, 19: W94T, 20: W93T. W101 und W20 waren gesunde Tiere, W81 und W120 chronisch WHV-infizierte ohne HCC. (Exposition 5 Tage, als Probe wurde humanes c-myc Exon 2 und 3 verwendet, siehe Legende Abb.4 und Methodenteil)

Überexpression und anormale Länge der c-myc mRNA wurde in den Tumorgewebeproben der Woodchucks W93 , W74 und W64 festgestellt (siehe Spur 2, 17 und 20 in Abb.3). Zur semiquantitativen Bestimmung der Überexpression und zur genaueren Grössenbestimmung der c-myc Transkripte wurde deshalb die poly-A⁺ Fraktionen der GesamtRNA aus diesen Gewebeproben isoliert, und ebenfalls einer Northern Analyse unterzogen.

1.2. ANALYSE POLYADENYLIERTER RNA AUS W93, W74 UND W64 LEBER

Aus GesamtRNA der tumoralen und nichttumoralen Leberpartien wurde durch Chromatographie an Oligo dT Zellulose die polyadenylierte RNA Fraktion abgetrennt. Zwei Aliquots der jeweiligen Präparationen wurden auf denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt und auf einen Nitrozellulosefilter übertragen, der anschliessend in zwei Teile zerschnitten wurde, welche zur Hybridisierung mit c-myc Exon 1 und Exon 2 als Probe dienten. Einer der beiden Filter wurde von der radioaktiven Sonde wieder befreit, und wurde mit c-myc Exon 3 hybridisiert. Eine abschliessende Hybridisierung mit β -Actin zeigte die gleichmässige Beladung der Gele mit poly-A⁺ RNA.

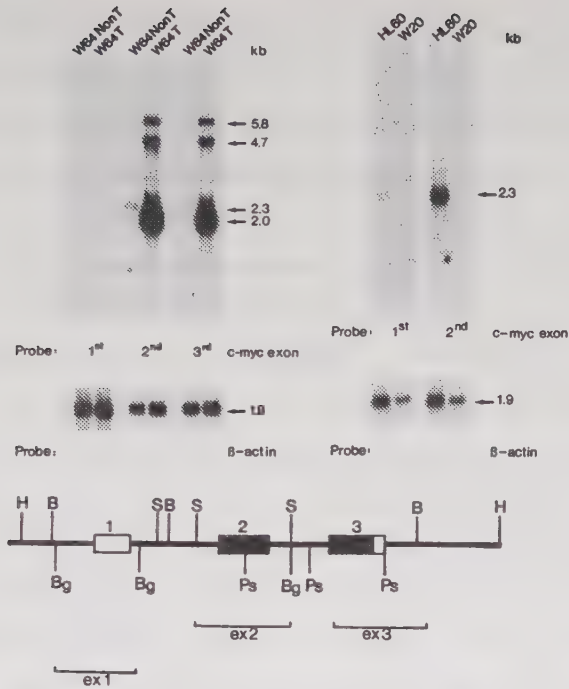


Abb.4. Northern Analyse von poly-A⁺ RNA aus W64 NT, T, HL60-Zellen und W20 normaler Leber :

Aufgetragen wurden 10 µg für W64 und 5 µg für W20 und die promyelozytische humane Zelllinie HL60 . Die Intensität der Banden tumoraler und nichttumoraler RNA wurde mit einem Beckman Densitometer verglichen. Des Wert für nichttumoraler Leber wurde willkürlich auf 1 festgelegt : vermessen wurde des Autoradiogramm der Exon 2 Hybridisierung bei einer Expositionszeit von 48 h. Als positive Kontrolle der Proben wurde poly-A⁺ RNA aus HL60 Zellen, die eine c-myc Amplifikation und Überexpression aufweisen, verwendet. RNA aus der Leber des gesunden Tieres W20 diene als normale Kontrolle. Als Längenstandard diene eukaryontische 28S und 18S rRNA (4,6 und 2,0 kb), sowie prokaryontische 23S und 16S rRNA (3,5 und 1,5 kb). Im unteren Teil ist die genetische Organisation des Woodchuck c-myc Gens wiedergegeben (siehe auch Kap.2). Offene Rechtecke repräsentieren das nichtkodierende Exon 1 und eine nichtkodierende 3' terminale Sequenz im dritten Exon. Schwarze Rechtecke stehen für die kodierenden Partien der Exons 2 und 3. Die Lokalisierung der als molekulare Sonden verwandten c-myc spezifischen DNA-Fragmente ist unterhalb des Restriktionskarte angegeben. (ex2,ex3: humane, ex1: Woodchuck Sequenz. Zur Etablierung dieser Restriktionskarte und zur Herkunft und Beschreibung der c-myc Proben siehe Kapitel 2 und Methodenteil. Abkürzungen : B: BamHI, Bg: BglII, E: EcoRI, H: HindIII, Ps: PstI, S: SacI).

Hybridisierung mit den Proben ex2 und ex3 zeigte im Nichttumorteil die normale 2,3 kb c-myc mRNA. Das Signal für Exon 1 ist hier sehr schwach (vgl. in Abb.5 für W93 und W74), was auf eine von den kodierenden Exons 2 und 3 verschiedene relative Basenzusammensetzung und geringere Hybridisierungseffizienz unter den gewählten Bedingungen zurückzuführen sein könnte. Denkbar wäre auch, dass die Synthese des grössten Teils einer 2,3 kb mRNA Population im ersten Intron initiiert, und ohne Unterbrechung bis ins 2. Exon fortgesetzt wurde. Solche mRNA Moleküle, die keine Sequenzen des ersten Exons enthalten, aber dennoch ein Molekulargewicht von 2,3 kb aufweisen, wurden bereits von Ray et al. (1987) beschrieben. Im Tumorteil wurde ein um 300 Nukleotide kürzeres, und über 50 fach überexprimiertes c-myc Transkript beobachtet, das ebenfalls keine Exon 1 Sequenzen enthält. Zwei zusätzliche c-myc spezifische mRNA Spezies von 4,7 und 5,8 kb hybridisieren ebenfalls nur mit den Proben ex2 und ex3. Die Synthese einer verkürzten c-myc mRNA könnte in diesem Fall von den erwähnten "kryptischen" Promotoren unmittelbar 5' des 2. Exons ausgehen (siehe Einführung).

Poly-A⁺ RNA aus der humanen promyelozytischen Zelllinie HL60 erkennt gut die homologe Exon 2 Probe, hybridisiert aber schlecht mit der heterologen Exon 1 Probe (siehe Abb. 4). Dies bestätigt die in der Literatur beschriebene Divergenz zwischen den nichtkodierenden c-myc Exons verschiedener Spezies (Bernard et al., 1983).

c-myc mRNA aus W20 normaler Leber liegt unter der Nachweisgrenze der Northern Analyse: Die Expression des c-myc Gens unterliegt offenbar einer Regulation, die vom augenblicklichen Status der Zelle abhängt.

Ruhende Zellen halten die Transkription auf einem niedrigen Niveau, während Zellteilungsprozessen steigt die Anzahl der c-myc mRNA Moleküle dagegen an (siehe Einführung). Da in den WHV infizierten, nichttumoralen Leberpartien der Woodchucks W64, W93 und W74 eine starke Virusreplikation (siehe Kap. 3) eine andauernde Regeneration der Zellen provoziert, steht eine stärkere Transkription im Vergleich zur ruhenden, normalen Leberzelle in W20 durchaus mit den oben beschriebenen Beobachtungen im Einklang.

Die Analyse der Tumor- (T) und Nichttumorteil (NT) der Lebergewebeproben von Woodchuck W93 und W74 wurde analog durchgeführt, und zeigte eine c-myc Überexpression um das 10fache in W93T und um das 5fache in W74T, jeweils bezogen auf die Expression im Nichttumorteil (Abb.5).

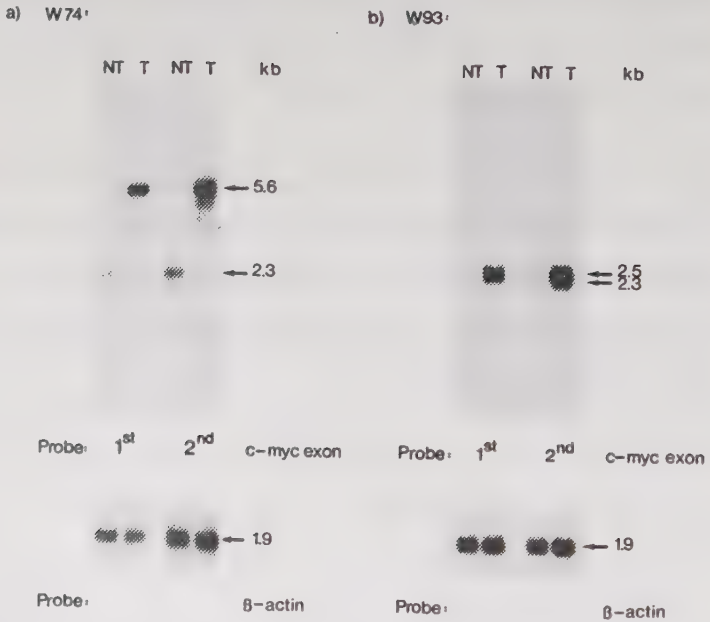


Abb.5. Northern Analyse polyadenylierter RNA aus W93 und W74 Leber :

10 μ g (W93) und 5 μ g (W74) poly-A⁺ RNA aus tumoraler und nichttumoraler Leber (T bzw. NT) wurde wie in Abb.4. beschrieben in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt, und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Die erhaltenen Filtersteifen wurden mit Proben ex1, ex2 und ex3 hybridisiert. Das Autoradiogramm nach Exon 3 Hybridisierung ist mit dem der Exon 2 Hybridisierung identisch und nicht in der Abbildung aufgeführt. Eine nachträgliche Hybridisierung der Filter mit β -Actin zeigte die gleichmässige Beladung der Gele mit poly-A⁺ RNA an. (Expositionszeit 48h).

Die c-myc spezifischen Transkripte in W93T können im Gegensatz zur normalen c-myc mRNA in W93 NT als gemischte Population aus RNA Molekülen mit einer Länge von 2,3 und 2,5 kb interpretiert werden. Dies könnte auf eine höhere Aktivität des Promotors P1 im c-myc Gen hindeuten. Ein derartiger Effekt wurde schon in Burkitt-Lymphomen und Plasmazelltumoren der Maus beschrieben (Taub et al., 1984 ; Yang et al., 1985). Die Existenz einer langen 5,6 kb c-myc mRNA in Tumor W74 (Abb.5) deutet auf eine Neuordnung der c-myc Transkriptionseinheit ausserhalb des Exon/Intron Bereiches hin, da dieses 5,6 kb Transkript Sequenzen aller drei c-myc Exons enthält.

1.3. Somatische Rekombinationen des c-myc Onkogens in W93, W74 und W64 HCC

DNA aus allen untersuchten Woodchuck Tumorgewebeproben wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut, und einer Southern Analyse unterworfen. Als Hybridisierungsprobe diente c-myc Exon 2. DNA aus W93, W74 und W64 HCC zeigte neben den normalen c-myc Banden zusätzliche hybridisierende Fragmente (nicht gezeigt). Ein Längenpolymorphismus kann mit Sicherheit für c-myc ausgeschlossen werden, da eine Southern Analyse von DNA aus 16 nichttumoralen und zwei normalen Leberbiopsien ausschliesslich normale c-myc Banden zeigte (nicht aufgeführt). Demnach muss sich in der DNA der Lebertumorzellen von W93, W64 und W74 ein Rearrangement eines c-myc Allels abgespielt haben, (zusätzliche Fragmente), während das zweite Allel unverändert blieb. Zur genaueren Untersuchung dieses Phänomens wurde

eine weitere Southern Analyse mit den drei Restriktionsenzymen Eco RI, BglIII und HindIII durchgeführt.

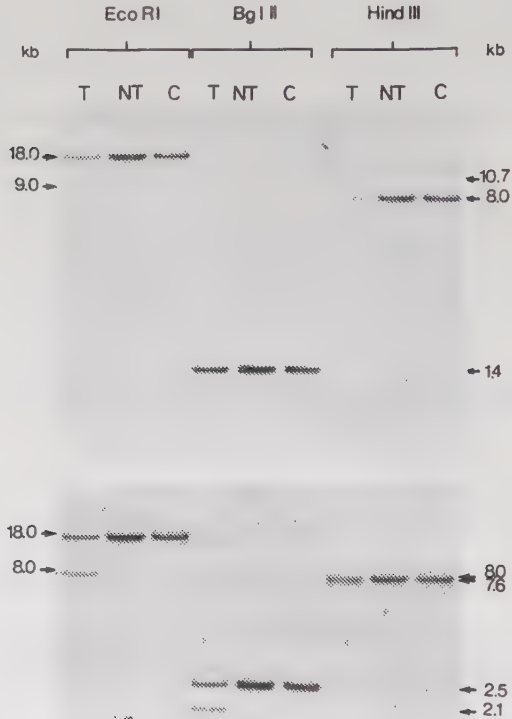


Abb.6. Southern Analyse von DNA aus W64 HCC (T), W64 nichttumoraler Leber (NT) und W20 normaler Leber (C) :
35 µg mit dem jeweiligen Restriktionsenzym verdaute, zelluläre DNA wurde auf 0,8%igen Agarosegelen aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Als Längenstandard wurden die Lambda Restriktionsfragmentgemische Lambda-II und Lambda-III verwandt (siehe Methodenteil). Die Membran wurde zunächst mit c-myc Exon 1 hybridisiert (oben), von der Probe durch Alkalibehandlung wieder befreit und dann mit dem 2. c-myc Exon hybridisiert (unten). Zur Lokalisierung der Proben siehe Legende zur Abb.4. Die Expositionszeit betrug 5 Tage.

Die Hybridisierung mit c-myc Exon 1 zeigt neben der normalen 18 kb EcoRI Bande ein zusätzliches Signal von 9 kb in der HCC DNA, ferner ist eine neue 10,7 kb Bande neben dem normalen 8 kb Signal im HindIII Verdau zu sehen. Das 1,4 kb BglII Fragment bleibt unverändert, mit Exon 2 als Probe erscheint jedoch neben dem normalen 2,5 kb BglII Fragment ein zweites um 400 bp verkürztes Fragment (2,1 kb, Abb. 6). Exon 3 Hybridisierung zeigt nur ein unverändertes BglII Fragment von 4,1 kb (in Abb.6 nicht gezeigt). Zur Überprüfung der Exon 1 Probe, die aus einem klonierten, normalen Woodchuck c-myc Allel stammt (siehe Methodenteil und Kap. 2), wurde die Nylonmembran mit einem 0,4 kb BamHI/SacI Fragment des Plasmids pMc-myc 54 (siehe Methodenteil), welches die Exon 1 Sequenzen einer Maus c-myc cDNA enthält, rehybridisiert. Die erhaltenen Signale waren zwar schwächer, aber mit den in Abb.6 (oberer Teil) identisch. Diese Southern Analyse wurde mit DNA aus zwei verschiedenen Regionen der W64 HCC Biopsie wiederholt. Position und Intensität der Banden waren eindeutig reproduzierbar, was auf einen monoklonalen Ursprung des Tumors schliessen lässt.

Die Verkürzung des Exon 2 enthaltenden BglII Fragments von 2,5 auf 2,1 kb (Abb.6) deutet stark auf einen Bruch eines c-myc Allels im ersten Intron und Rekombination mit anderen zellulären Sequenzen hin. Während dieses Rearrangements könnte in einem Teil der Zellen die Region des ersten c-myc Exons des rearrangierten Allels deletiert worden sein, was die schwache Hybridisierung der 9 kb EcoRI und 10,7 kb HindIII Fragmente erklären könnte (Abb. 6). Die Synthese einer verkürzten mRNA (siehe Abb. 4) kann mit einer Rekombination des c-myc Gens im 1 Intron gut in Einklang gebracht werden.

Der Nylonfilter wurde einer letzten Hybridisierung mit dem Vektorplasmid pBR322 als Probe unterzogen, um eventuelle Kontaminationen oder falsche Signale ausfindig zu machen. Alle Signale waren jedoch c-myc spezifisch.

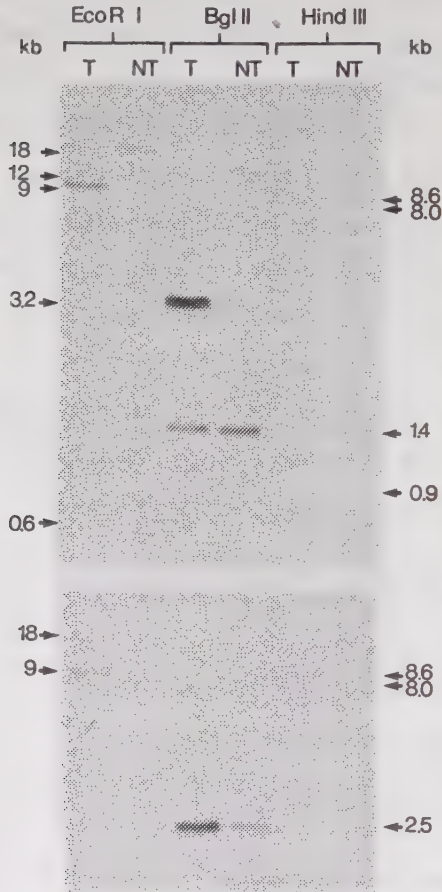


Abb.7. Southern Analyse von DNA aus W93 HCC (T) und W93 nichttumoraler Leber (NT):

Durchführung der Analyse wie in Abb.6 beschrieben; Expositionszeit 5 Tage. Oberer Teil: Hybridisierung mit Exon 1, unterer Teil: Hybridisierung mit Exon 2. (Kontrollhybridisierung mit pBR322 negativ)

Die Situation in W93 HCC (Abb.7) ist komplizierter als für W64 HCC : Hybridisierung mit c-myc Exon 1 in W93 Tumorzellen zeigt drei zusätzliche EcoRI Fragmente (0,6, 9 und 12 kb), zwei zusätzliche HindIII Fragmente (8,6 und 0,9 kb) und ein zusätzliches BglII Fragment von 3,2 kb (Abb.7 oberer Teil). Mit einer Exon 2 Probe wurden nur noch das 9 kb EcoRI Fragment und das 8,6 kb HindIII Fragment als tumorspezifisch erkannt. Das 2,5 kb BglII Fragment, welches die Exon 2 Sequenzen einschliesst (Abb.7, unterer Teil), und auch das 4,1 kb BglII Fragment, das das Exon 3 enthält, bleiben unverändert (nicht gezeigt). Ein Rearrangement muss deshalb im 1,4 kb BglII Fragment zwischen der BglII Schnittstelle und dem 5' Ende des ersten Exons stattgefunden haben. Ausserdem setzt die Existenz einer mRNA mit 2,3-2,5 kb eine unversehrte Transkriptionseinheit voraus (siehe Abb.5). Die unterschiedliche Intensität der Banden kann mehrere Ursachen haben: Ein ungleichmässiger Transfer vom Agarosegel auf die Nylonmembran oder Duplikation oder Amplifikation von Teilen des c-myc Gens während des Rearrangements.

In DNA von W74 HCC sind für Exon 1 spezifische zusätzliche EcoRI und HindIII Banden von 15 und 10 kb zu beobachten. Hybridisierungen mit Exon 2 und 3 zeigen keine weiteren, tumorspezifischen Signale (nicht in Abb.8 aufgeführt). Da das Exon 3 BglII Fragment mit 4,1 kb Länge die 3' HindIII Schnittstelle des c-myc Gens einschliesst, muss ein Rearrangement zwischen der HindIII und der BamHI Schnittstelle 5' des 1. Exons angenommen werden. Die zusätzlichen tumorspezifischen Signale sind sehr schwach, was auf eine gemischte Population aus tumoralen und nichttumoralen Zellen in der W74 Gewebeprobe hindeutet. Dieser Umstand erschwert eine klare Interpretation der Southern Analyse

und lässt die Lokalisierung des Bruchpunktes 3' oder 5' des c-myc Gens offen. Eine Southern Analyse der DNA aus verschiedenen Regionen der Gewebeprobe zeigte dasselbe Resultat für die Exon 1 Hybridisierung. Eine genaue Analyse dieses Falles wird zur Zeit von Dr. M.A. Buendia (Institut Pasteur) durchgeführt.

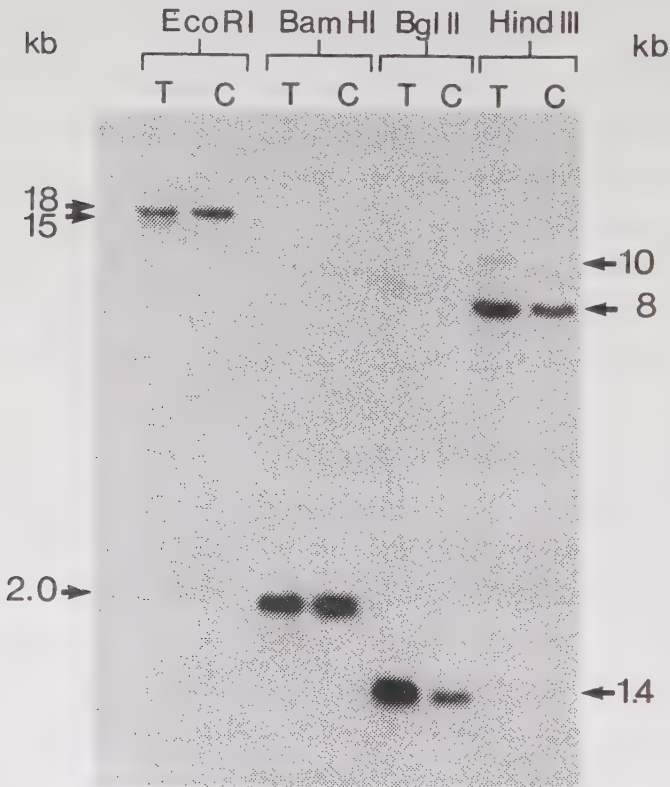


Abb.8. Southern Analyse von W74 HCC DNA und W20 normaler DNA : Vorgehen wie in Abb.6 und 7 beschrieben, Exposition 5 Tage, Probe : 1. c-myc Exon, pBR322 Kontrollhybridisierung negativ.

Die Abbildung 9 hilft die in diesem Kapitel vorgestellten Daten zu resümieren : In drei von neun untersuchten HCC Gewebeproben chronisch WHV-infizierter Woodchucks werden 5-50 fache Überexpression, sowie Rearrangements des c-myc Proto-Onkogens festgestellt. Diese Aktivierung des c-myc Gens geht in allen drei Fällen mit einer Produktion von Transkripten anormaler Länge einher. Die mutmasslichen Rekombinationsstellen liegen 5' des ersten Exons oder im ersten Intron des Gens. Diese Befunde gleichen den Daten, die über c-myc Aktivierung in Burkitt-Lymphomen, humanen B- und T-Zelltumoren und Maus Plasmacytomen berichtet wurden (Shen-Ong et al., 1982, Klein et al., 1985, Ar-Rushdi et al., 1983).

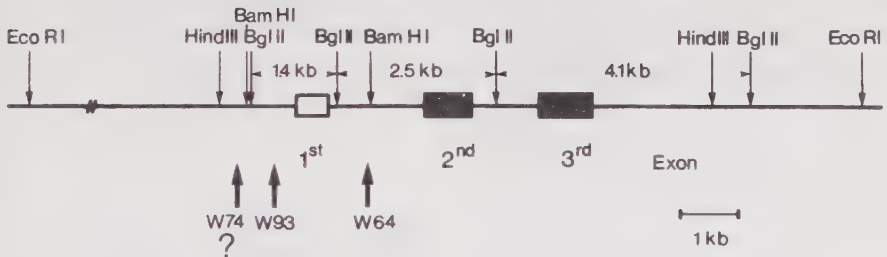


Abb.9. Mutmassliche Rekombinationsstellen in W93 HCC, W74 HCC und W64 HCC :

Nach den Daten der Southern Analyse wurde eine grobe Restriktionskarte des c-myc Gens erstellt ; die möglichen Rekombinationsbereiche sind für jeden Fall mit einer Pfeilspitze gekennzeichnet.

Die eindeutige Aufklärung der Rearrangements kann nur durch eine weitere Untersuchung mit Hilfe molekularer Klonierung und Sequenzierung erreicht werden. W64 HCC DNA wurde für diese Untersuchung ausgewählt, da die Resultate mit c-myc spezifischen und WHV- spezifischen Proben (siehe S.31 und Kap. 3) die Monoklonalität des Tumors und die Homogenität der Gewebeprobe zeigten. Die Ergebnisse sind im folgenden Kapitel wiedergegeben.

2. CHARAKTERISIERUNG DER REKOMBINATION DES c-MYC ONKOGENS IN W64 HCC

W64 HCC DNA wurde partiell mit Sau3A verdaut und in die BamHI Schnittstelle des Phagen Lambda L47.1 ligiert. Eine Bibliothek von 2×10^6 rekombinanten Phagen wurde ausplattiert und auf Nitrozellulosefilter übertragen (siehe Methodenteil). Die Hybridisierung dieser Filter mit c-myc Exon 2 und 3 (siehe Legende zur Abb.4) erlaubte die Identifizierung von 11 unabhängigen c-myc positiven Klonen, die durch mehrfaches Ausplattieren und Hybridisieren gereinigt und amplifiziert wurden.

2.1. Das normale c-myc Allel

Die sich überlappenden Klone Nr. 2, 11/3, 12, 47 und 106 enthalten Insertionen zwischen 12 und 16 kb , wobei jede die gesamte c-myc Region des normalen c-myc Allels überspannt. Die Analyse der Phagen DNA zur Etablierung einer Restriktionskarte der Woodchuck c-myc Region und die Plazierung der drei Exons ist hier am Beispiel des Klons Nr. 11/3 erläutert (Abb. 10).

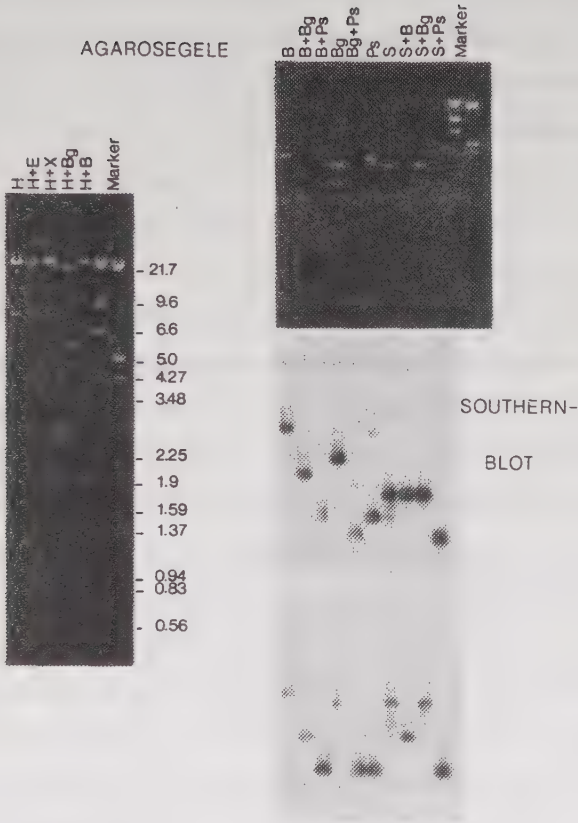


Abb.10. Restriktionsspaltungen von DNA des Phagen Nr.11/3 und Southern Analyse :

GesamtDNA aus Phagen (links) sowie ein 8 kb HindIII Fragment des Inserts (rechts) wurde mit den angegebenen Enzymen hydrolisiert und auf Agarosegelen aufgetrennt. Die Restriktionsfragmente des 8 kb HindIII Fragments wurden einer Southern Analyse unterzogen. Als Längenstandard wurden die Lambda-II und Lambda-III Restriktionsfragmentgemische verwandt. Alle Angaben in kb.

Die Southern Analyse in Kapitel 1 hatte bereit gezeigt, dass ein 8 kb HindIII Fragment die Sequenzen aller 3 c-myc Exons enthält, wobei jedes Exon von BglIII Schnittstellen flankiert ist. Die Exons 1, 2 und 3 entsprechen BglIII Fragmenten von 1,4, 2,5 und 4,1 kb, Exon 1 überdies einem BamHI Fragment von 2,0 kb. Restriktionsverdau der DNA des Phagen Nr.11/3 zeigte ein 8 kb HindIII Fragment, das keine EcoRI oder XhoI Schnittstellen, dafür aber BglIII und BamHI spezifische Spaltsequenzen besitzt (Abb.10, linker Teil). Das 8 kb HindIII Fragment wurde in die Polylinkersequenz des pBR322 Derivats pGEM-1 subkloniert. Das erhaltene rekombinante Plasmid pMH2 wurde amplifiziert und das gereinigte 8 kb HindIII Fragment mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut (Abb.10, rechter Teil). Die im Agarosegel enthaltene DNA wurde auf Nylonmembranen transferiert, und einer Southern Analyse mit Exon 2 und Exon 3 Proben unterzogen (Abb.10, Southern blot). Von den vier BamHI Fragmenten (4,1, 2,0, 1,4 und 0,5 kb) hybridisierte das 4,1 kb Fragment mit Sequenzen von Exon 2 und Exon 3, von den vier BglIII Fragmenten (3,48, 2,56, 1,4 und 0,56 kb) hybridisierte das 3,48 kb Fragment mit Exon 3, das 2,5 kb Fragment mit Exon 2 (Abb.10). Der Verdau des intakten Plasmids pMH2, welches keine BglIII und nur eine BamHI Schnittstelle direkt neben der HindIII Sequenz enthält, hatte gezeigt, dass das 0,5 kb BamHI Fragment ebenso wie das 0,56 kb BglIII Fragment am linken Ende des HindIII Fragments, das 4,1 kb BamHI und das 3,48 kb BglIII Fragment jedoch am rechten Ende des HindIII Fragments liegen (nicht gezeigt). Durch eine 5' nach 3' Anordnung der mit den Exons 2 und 3 hybridisierenden und 4,1, 3,48 und 2,5 kb Fragmente konnten die BamHI und BglIII Schnittstellen wie auf der in Abb.11 wiedergegebenen Restriktionskarte positioniert werden.

Das 1,6 kb SacI Fragment hybridisiert mit Exon 2 Sequenzen, ist also ein internes Fragment. Das 0,66 kb SacI Fragment muss direkt 5' des 1,6 kb Fragmentes liegen, da einerseits diese 660 bp eine BamHI Schnittstelle aber keine Exon 3 Sequenzen enthalten, jedoch andererseits das 1,4 kb BglIII Fragment nicht durch SacI verdaut wird. Doppelverdau mit BglIII und PstI zeigt zwei mit Exon 2 hybridisierende Banden d.h. eine PstI Schnittstelle muss im 2. Exon liegen.

Nach Doppelverdau SacI/PstI verschwindet die 1,6 kb Exon 2 Bande und hinterlässt zwei fast gleichgrosse, ca. 0,8 kb lange Fragmente, die mit Exon 2 hybridisieren. Eine PstI Schnittstelle wurde daher in die Mitte des 1,6 kb SacI Fragmentes gelegt. Das einzige mit Exon 3 hybridisierende 1,25 kb PstI Fragment wurde mit Hilfe des Exon 2 Sequenzen enthaltenden 1,16 kb PstI Fragment plaziert und lässt Raum für ein viertes 1,9 kb PstI Fragment. Die Tatsache, dass weder das 1,9 kb PstI Fragment noch das 1,4 kb BamHI Fragment mit der Exon 3 Probe reagieren, lässt sich damit erklären, dass diese Probe humane, nicht kodierende Sequenzen 3' des c-myc Gens enthält, die nicht konserviert sind, und daher unter den stringenten Bedingungen der Southern Analyse nicht mehr hybridisieren. Ein Vergleich mit der Restriktionskarte des humanen c-myc Gens zeigt, dass die innerhalb des Gens liegenden 0,66 und 1,6 kb SacI Fragmente konserviert sind (zur Anordnung der Fragmente siehe Abb. 11). Die partielle Sequenzierung des Intronbereiches im 0,66 kb SacI Fragment bestätigte dies (Kap. 2.5.). Unter der Annahme, dass die Exon-Intron Grenzen des Woodchuck und des humanen c-myc Gens weitgehend identisch sind wurde ein ca. 770 bp langes Exon 2 in das 1,6 kb SacI Fragment gelegt ; Exon 1 und 3 (560 bp bzw 900 bp für humanes c-myc)

wurden gemäss der Länge der Introns (1,5 bzw 1,1 kb für humanes c-myc) plaziert. (Daten für humanes c-myc aus Gazin et al., 1984). Die komplette Restriktionskarte ist in Abb.11 wiedergegeben. Die zusätzlichen Restriktionsschnittstellen 3' und 5' des 8 kb HindIII Fragments wurden aus der Analyse der Gesamt-DNA des Klons Nr.47 ermittelt (nicht gezeigt). Die Klone Nr.45, Nr.9 und Nr.25 reichen mit ihrem 5' Ende nur bis ins 2. bzw 1. c-myc Intron.

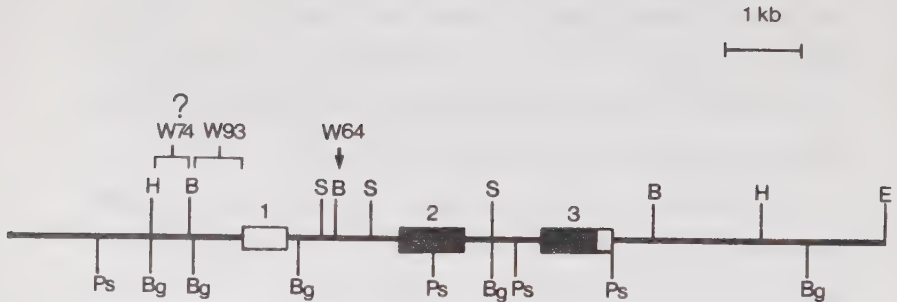


Abb.11. Struktur und genetische Organisation des normalen Woodchuck c-myc Gens :

Die drei c-myc Exons sind durchnummeriert. Kodierende Bereiche sind als schwarze, nichtkodierende Bereiche als offene Rechtecke wiedergegeben. Zur Positionierung der Schnittstellen sowie der Intron-Exon Grenzen siehe Text. Abkürzungen der Restriktionsenzymnamen wie in Abb.4.

2.2. Das rearrangierte c-myc Allel

Die Klone Nr.63, Nr.100 und Nr.74 enthalten zwar Sequenzen der c-myc Exons 2 und 3, aber keine Exon 1 Sequenzen. Da das 5' Ende ihrer Inserts über das erste c-myc Intron hinausging, konnten sie als Kandidaten für das rearrangierte c-myc Allel angesehen werden. Tatsächlich zeigte eine Restriktions- und Southern Analyse der drei Klone, dass sie überlappend ca. 14 kb des rearrangierten c-myc Allels überspannen. Der Rekombinationspunkt liegt im ersten Intron. Die Kartierung des rearrangierten Allels wird im folgenden am Beispiel des Klons Nr.63 erläutert (Abb. 12) :

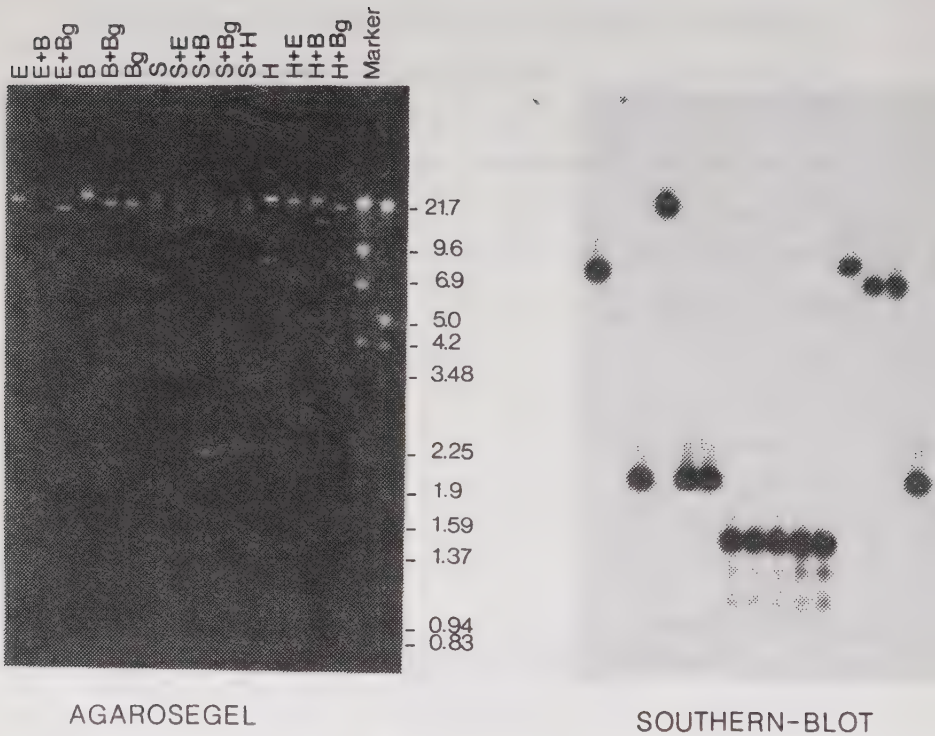


Abb.12. Restriktionsspaltungen der DNA des Phagen Nr.63 und Southern Analyse :

Phagen DNA wurde mit den angegebenen Restriktionsenzymen gespalten und nach Auftrennung in Agarosegelen auf eine Nylonmembran übertragen (Southern-Blot). Die Hybridisierung erfolgte mit dem 2. c-myc Exon. Längenstandards wie in Abb.10. Alle Angaben in kb.

Lambda-L47.1 enthält eine BglIII Schnittstelle 3,6 kb von der BamHI Klonierungsstelle entfernt auf dem rechten "Phagenarm" und eine weitere ca. 400 bp von der "cos" Stelle des "linken Phagenarmes" entfernt (Restriktionskarte von Lambda-41.1, siehe Maniatis et al., 1982). Daher muss das mit c-myc Exon 2 hybridisierende 2,1 kb BglIII Fragment innerhalb des Inserts liegen. Das 1,6 kb SacI Fragment, das ebenfalls mit Exon 2 Sequenzen hybridisiert, muss in diesem 2,1 kb BglIII Fragment liegen. Die Länge der mit Exon 2 hybridisierenden BamHI Bande kann folgendermassen errechnet werden : mit einer Insertlänge von 10,9 kb hat dieser rekombinante Phage eine Grösse 44,98 kb. Ein BamHI Fragment grösser als 20 kb ist nur unter Mitwirkung des grossen "linken Phagenarmes" denkbar. Subtrahiert man die restlichen, nicht hybridisierenden BamHI Fragmente von der Gesamtlänge des Phagen Nr.63, so ergibt sich die genaue Position einer BamHI Schnittstelle 6,0 kb von der linken Klonierungsstelle. Da die 2,3 und 1,5 kb Sac Fragmente nicht von BamHI gespalten werden, müssen sie links von dieser BamHI Schnittstelle liegen. Die Länge der restlichen BglIII Fragmente positionieren das 2,1 kb BglIII Fragment so, dass eine BglIII Stelle mit einer SacI Stelle zusammenfällt. 1,6 kb links davon befindet sich eine weitere SacI Stelle, 2,1 kb rechts eine BamHI Stelle ; dieses Muster ist identisch mit der Exon 2/Exon 3 Region des normalen c-myc Allels. (Eine Kontrollhybridisierung der Nylonmembran mit Exon 3 bestätigte dies, ist hier aber nicht gezeigt). Das 2,1 kb BglIII Fragment entspricht dem tumorspezifischen BglIII Fragment der Southern Analyse zellulärer DNA aus W64 HCC (siehe Kap. 1.3). Damit können die restlichen Schnittstellen plazierte und auch das tumorspezifische 8 kb EcoRI Fragment der Southern Analyse erklärt werden (siehe Abb.12, EcoRI Verdau : ein 8 kb Fragment

hybridisiert mit der c-myc Exon 2 Probe). Unter Zuhilfenahme der Klone Nr.100 und Nr.74 konnte die in Abb.13 wiedergegebene Restriktionskarte erstellt werden. Der Rekombinationspunkt liegt 5' des 1,6 kb SacI Fragments aber noch im 2,1 kb BglII Fragment, Abb.13.

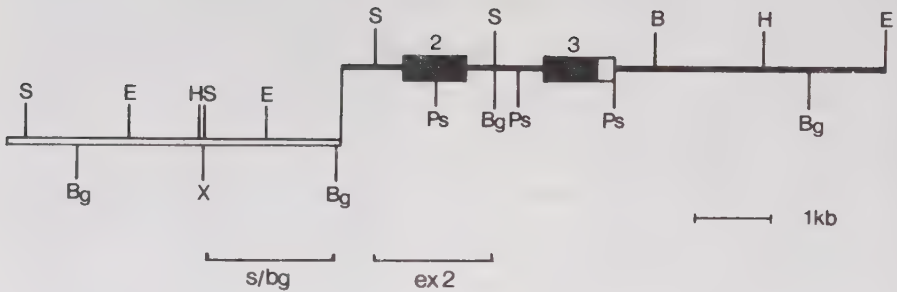


Abb.13. Struktur und genetische Organisation des in W64 Hepatomzellen rearrangierten c-myc Gens:

c-myc Sequenzen sind durch eine durchgehende Linie, mit c-myc rekombinierte Partnersequenzen durch eine offen gezeichnete Linie dargestellt. Zur Lagebestimmung des Rekombinationspunktes siehe Text. (Abkürzungen der Enzymnamen wie in Abb.4 ; X:XhoI). Angegeben ist ebenfalls das als Probe verwendete Fragment s/bg.

2.3. Das mit c-myc rekombinierte Partnerallel

Das DNA Fragment SacI-BglIII unmittelbar 5' des Bruchpunkts (im folgenden als s/bg bezeichnet, siehe Abb. 13) wurde als Probe verwandt, um etwa 10^6 rekombinante Phagen der erstellten Genbibliothek nach dem normalen c-myc Partnerallel durchzutesten. Vier positive Klone - Nr.63/2, Nr.65, Nr.80 und Nr.85 - wurden erhalten. Die DNA des Phagen Nr. 85 wurde nach den oben beschriebenen Verfahren kartiert (Abb.14).

Um die Restriktionskarte der 12,4 kb Insertion des Phagen Nr. 85 analog zum rearrangierten c-myc Gen in 5' nach 3' Richtung anzuordnen wurde der kurze Phagenarm links und der lange Phagenarm rechts positioniert. Ein Verdau mit BglIII zeigt vier Fragmente : die beiden "Arme" von ca. 30 und 6,8 kb, ein aufgrund seiner Länge von 3,3 kb internes Fragment und ein 6,8 kb Fragment, das demnach Vektor und Insertsequenzen enthalten muss. XhoI spaltet das interne 3,3 kb BglIII Fragment, welches auch s/bg Sequenzen enthält, verdaut aber nicht die 8,5 und 6,5 kb HindIII Fragmente. Da das kleinere XhoI Fragment ca. 15 kb lang ist, muss es mit einer HindIII Stelle in der Mitte des 3,3 kb BglIII Fragments zusammenfallen. Ferner spaltet XhoI ein 1,7 kb EcoRI Fragment, welches ebenfalls mit s/bg hybridisiert (Abb. 14). Dieses Restriktionsmuster ist identisch mit dem des 3,3 kb BglIII Fragments des rearrangierten c-myc Allels 5' des Rekombinationspunktes. Zur Orientierung dieses beinahe symmetrischen Musters dient die BamHI Schnittstelle. Das kleinere BamHI Fragment hat eine Länge von ca. 20 kb. Diese Schnittstelle muss deshalb 3' der XhoI Schnittstelle liegen. Ein mit s/bg Sequenzen

hybridisierendes 3,8 kb EcoRI/BamHI Fragment kann die BamHI Spaltstelle präzise lokalisieren.

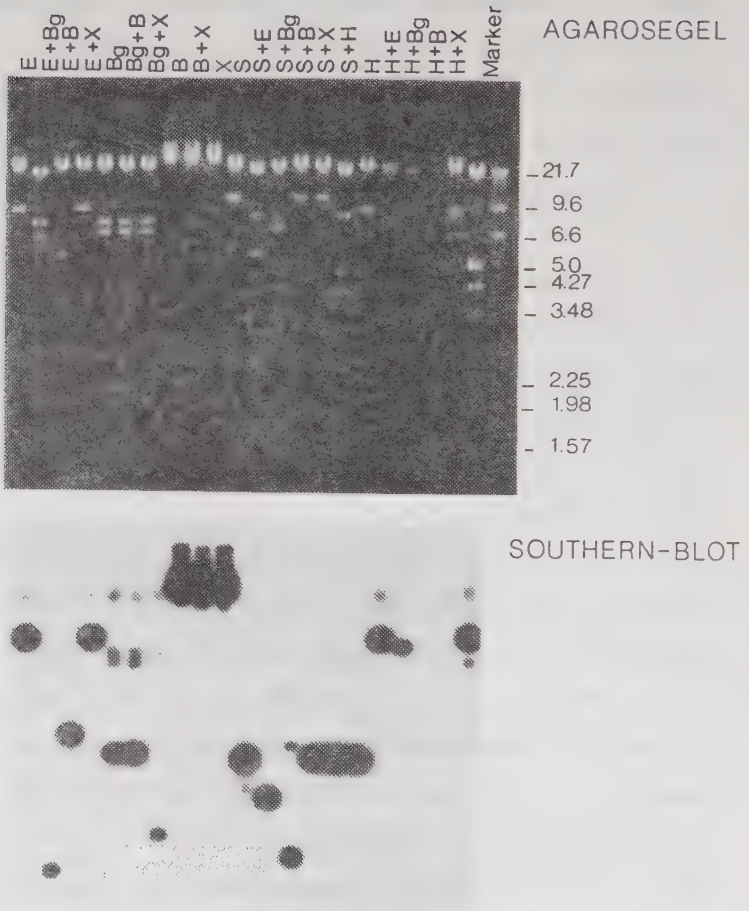


Abb. 14. Restriktionsspaltungen von DNA des Phagen Nr.85 und Southern Analyse:

Agarosegel (oberer Teil), Southern-Membran (unterer Teil), die Hybridisierung erfolgte mit der s/bg Probe. Längenstandards wie in Abb. 10. Alle Angaben in kb.

Mit der Plazierung einer *SacI* Stelle wenige Nukleotide 3' von *XhoI*, analog zur Kartierung des rearrangierten *c-myc* Allels, kann ein 3,3 kb *SacI* Fragment, das mit der *s/bg* Probe hybridisiert, ebenfalls 3' des *XhoI* Stelle positioniert werden (Abb. 14 und 15). Das 8,5 kb *HindIII* Fragment wurde in pGEM-3 subkloniert und nochmals durch Restriktionsverdau analysiert (nicht gezeigt). Die Lage aller Schnittstellen konnte bestätigt werden. Eine zusätzliche *BglIII* Stelle, die das 8 kb *EcoRI* Fragment zerschneidet, sowie zwei weitere *SacI* Stellen konnten identifiziert werden .

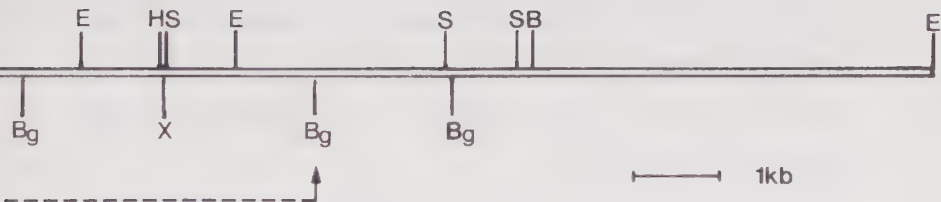


Abb. 15. Restriktionskarte des mit *c-myc* rekombinierten Partnerallels: Der gestrichelte Bereich ist mit der mit *c-myc* rekombinierten Region identisch (vgl. Abb.13). Weitere Beschreibung siehe Text. (Abkürzungen wie in Abb.4).

2.4. Die Region des Bruchpunktes

Zur präzisen Lokalisierung und Charakterisierung der Rekombinationstelle, wurde das 2,3 kb *SacI* Fragment des rearrangierten *c-myc* Allels, welches die Bruchpunktregion einschliesst, sowie ein entsprechendes Fragment des normalen *c-myc* Allels sequenziert. In Abb. 16 sind das rearrangierte und das normale Allel zum Vergleich untereinander angeordnet (b, a). Die Nukleotidsequenz der Bruchpunktregion ist unterhalb des rearrangierten Allels als vergrösserter Ausschnitt wiedergegeben. Der Vergleich mit dem humanen *c-myc* Intron Bereich (Gazin et al., 1984) zeigt die gute Konservierung dieser Sequenz. Die *SacI* Schnittstelle unmittelbar 5' des zweiten Exons dient als Orientierung zur Anordnung der Sequenzen W *c-myc* und H *c-myc*, also der normalen Woodchuck Sequenz und der humanen Sequenz des ersten *c-myc* Introns. Der Vergleich mit der Sequenz des rearrangierten *c-myc* Allels (W64 HCC, in Abb. 16) lokalisiert den Bruchpunkt 506 Nukleotide 5' der *SacI* Schnittstelle. Er liegt damit genau in dem Bereich, der schon für eine Reihe anderer rekombinierter *c-myc* Allele in Maus Plasmazytomen oder humanen B-Zell Tumoren beschrieben wurde (Stanton et al., 1983 und Piccoli et al., 1984).

Ein Vergleich mit den Sequenzen bereits publizierter Bruchpunktregionen (Stanton et al., 1983) zeigte, dass kryptische Promotoren 5' des Bruchpunktes intakt blieben. Diese dirigieren wahrscheinlich die Synthese der 2,0 kb *c-myc* mRNA in W64 HCC (Abb. 4).

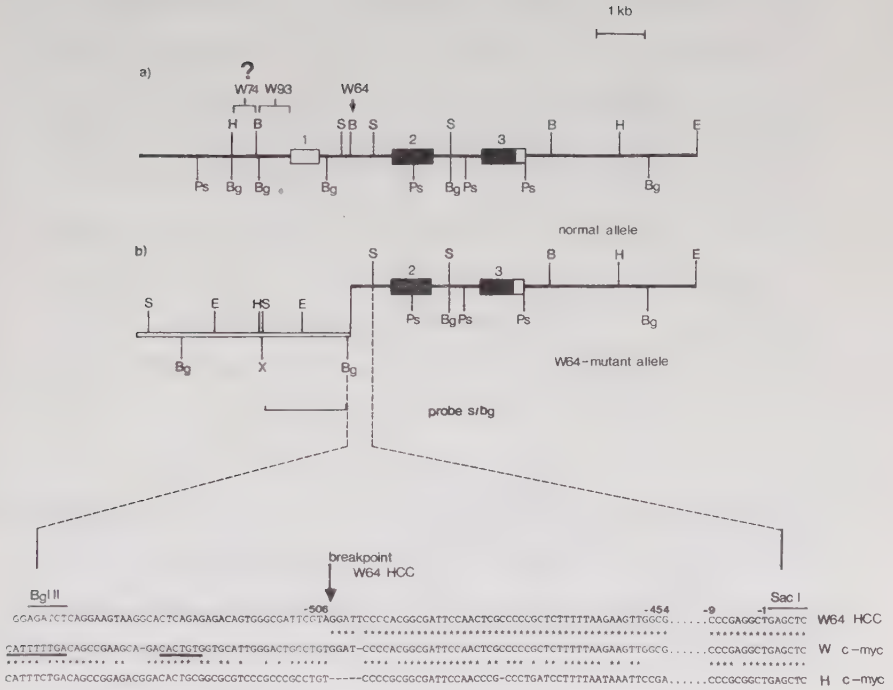


Abb. 16. Schema des c-myc Rearrangements in W64 HCC und der Bruchpunkregion:

(a) Restriktionskarte des normalen c-myc Allels.

(b) Restriktionskarte des rearrangierten c-myc Allels. Mit c-myc rekombinierte Sequenzen sind als offene Linie dargestellt. Der Bereich zwischen SacI und BglIII 3' und 5' der Rekombinationsstelle sind unterhalb des rearrangierten Allels als Nukleotidsequenz angegeben (W c-myc : Woodchuck Sequenz, H c-myc : humane Sequenz, Abkürzungen der Restriktionsenzymnamen wie in Abb. 4, Sterne repräsentieren homologe Nukleotide).

Die Sequenzierung der entsprechenden Region des Partnerallels bestätigt die Lokalisierung des Bruchpunktes. Die Feinstruktur der Rekombinationsstelle ist zusammen mit der Partnersequenz nochmals in Abb. 17 wiedergegeben und zeigt eine Tetranukleotidsequenz GGAT, die in der Partnersequenz sowie im rearrangierten und normalen c-myc Intron 1 enthalten ist (Abb. 17, Kasten).

.....G C G A T T C G T A	G G A T	G A G A T C A G A.....	Partnersequenz
* * * * *	* * * *		
.....G C G A T T C G T A	G G A T	T C C C C A C G G.....	W64 HCC
	* * * *	- * * * * * * *	
.....G A C T G C C T G T	G G A T	- C C C C A C G G.....	W c-myc
* * * * *		* * * * *	
.....G C C C G C C T G T	- - - -	- C C C C G C G G.....	H c-myc

Abb.17. Bruchpunktregion:

H c-myc : Human c-myc Intronsequenz, W c-myc : Woodchuck c-myc Intronsequenz. W64 HCC Sequenz des rearrangierten Allels. Sterne markieren homologe Nukleotide. Anordnung der Sequenz 5'→3'.

2.5. Versuche zur Identifizierung der mit c-myc rekombinierten Partnersequenz

Die DNA der Phagen Nr.74, 100 und 63 enthielt keine Sequenzen des Woodchuck Hepatitis Virus, wie eine Hybridisierung mit der 3,3 kb genomischen WHV Probe (siehe Methodenteil) zeigte. Dieses Ergebnis schliesst mit einiger Sicherheit die direkte Mitwirkung des Virus bei der c-myc Aktivierung in W64 HCC aus. Das in Abb. 16 wiedergegebene Fragment s/bg wurde als Probe für eine Southern Analyse HindIII verdauter DNA aus W64 HCC, W64 nichttumoraler Leber und W20 normaler Leber eingesetzt. In W64 HCC DNA zeigt eine zusätzliche 7,6 kb Bande das Rearrangement des mit c-myc rekombinierten Partnerallels an. Diese Bande ist mit dem ebenfalls für W64 HCC spezifischen 7,6 kb HindIII Restriktionsfragment der Exon 2 Hybridisierung identisch (siehe Abb. 18, und HindIII Verdau in Abb. 6). Ein Allel der s/bg Region hat demnach eine Rekombination mit c-myc durchgemacht, während das zweite Allel unverändert blieb, (17 kb Bande in Abb. 18). s/bg Sequenzen sind zellulären Ursprungs, nicht repetitiv und existieren auch in humaner DNA (Southern Analyse für letzteres nicht gezeigt.)

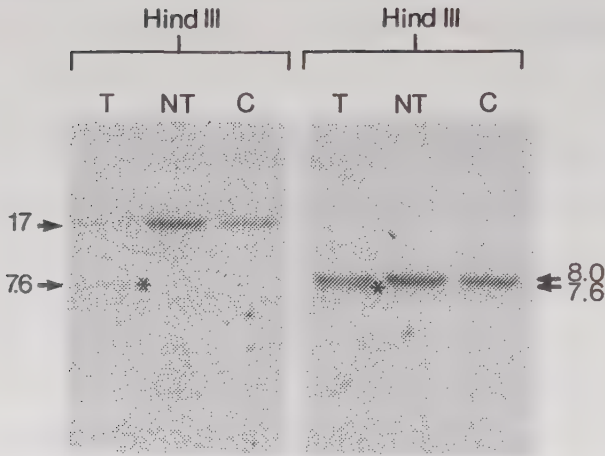


Abb.18. Southern Analyse von DNA aus W64 HCC (T), W64 nichttumoraler Leber (NT) und W20 normaler Leber (C):

35 µg HindIII verdauter DNA wurden auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetragen, auf eine Nylonmembran übertragen und mit der s/bg Probe hybridisiert, linker Teil. Die Membran wurde von der radioaktiven s/bg Probe befreit und mit Exon 2 hybridisiert, rechter Teil. DNA aus W64 HCC zeigt nach Hybridisierung mit s/bg (links) das rearrangierte 7,6 kb HindIII Fragment, nach Hybridisierung mit Exon 2 (rechts) zwei eng beieinanderliegende Fragmente von 8,0 und 7,6 kb, siehe Sternmarkierungen. (Expositionszeit 5 Tage, Längenstandards wie in Abb. 6).

In der Northern Analyse (Abb.19a) hybridisiert das s/bg Fragment mit einem 4,6 kb RNA Molekül, welches nach der Intensität der Banden im Autoradiogramm in W64 nichttumoraler Leber, W64 HCC, und in den normalen Lebergeweben der Tiere W101 und W20 stark vertreten ist.

In W64 HCC kann ein zusätzliches RNA Molekül beobachtet werden, das mit 5,8 kb dieselbe Länge hat wie das grösste der mit c-myc Exon 2 und 3 hybridisierenden Transkripte dieses Tumorgewebes (vgl. Abb. 4).

Dieser Befund bestätigt die Annahme, dass es sich bei den c-myc spezifischen Transkripten von 4,7 und 5,8 kb um Kotranskripte (Abb. 4) zwischen c-myc und Partnersequenzen handelt.

Eine Northern Analyse der poly-A⁺ und der poly-A⁻ Fraktionen von W64 HCC und W64 nichttumoraler GesamtRNA mit s/bg als Probe ist in Abb. 19b wiedergegeben und zeigt folgendes : s/bg spezifische RNA Moleküle existieren sowohl in poly-A⁺ als auch in poly-A⁻ Form. Die Kotranskripte (4,7 und 5,8 kb) sind eindeutig polyadenyliert. Das normale 4,6 kb Transkript ist nur in W64 nichttumoralen Leberzellen als poly-A⁺ und poly-A⁻ RNA präsent, nicht aber in der W64 HCC poly-A⁺ Fraktion. Das normale 4,6 kb Transkript ist um 100 Nukleotide kürzer als das kleinere Kotranskript (4,7 kb), und so von diesem zu unterscheiden (Abb. 19b). Diese Resultate könnten damit erklärt werden, dass das 4,6 kb Transkript in normalem Lebergewebe nur teilweise polyadenyliert wird, während dieser Schritt im Reifungsprozess der mRNA Moleküle im W64 Tumor ganz unterbleibt. Eine zusätzliche Hybridisierung mit β -Actin zeigt die gleichmässige Beladung des Gels mit poly-A⁺ RNA, aber auch die Trennung der poly-A⁺ und der poly-A⁻ Fraktion.

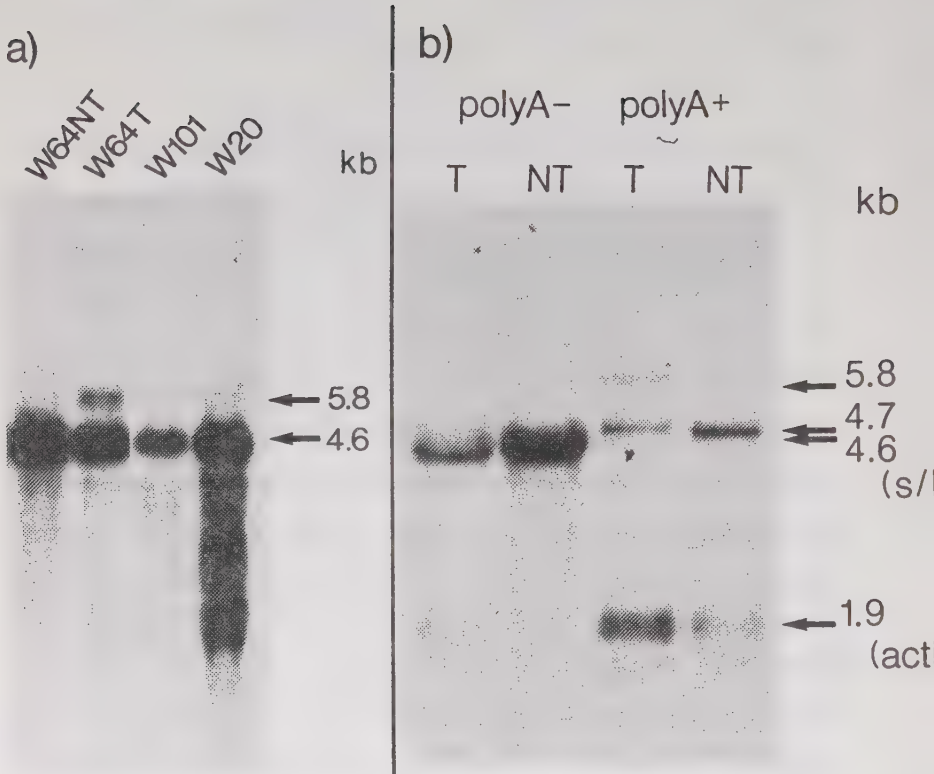


Abb.19. Northern Analyse s/bg spezifischer RNA:

a) 40 µg GesamtRNA aus W64 HCC (T) und aus W64 nichttumoraler Leber (NT) wurden auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und nach Transfer auf Nitrozellulose mit s/bg hybridisiert.

b) 20 µg polyA⁻ und 3 µg polyA⁺ RNA wurden mit Glyoxal denaturiert (Maniatis et al., 1982) auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Transfer und Hybridisierung wie in a. (Expositionszeit 2 Tage, Längenstandards wie in Abb. 3 und 4 beschrieben).

Die Northern Analyse von GesamtRNA aus verschiedenen Woodchuck Organen zeigt eine wahrscheinlich leberspezifische Expression des oben beschriebenen 4,6 kb Transkripts (Abb.20).

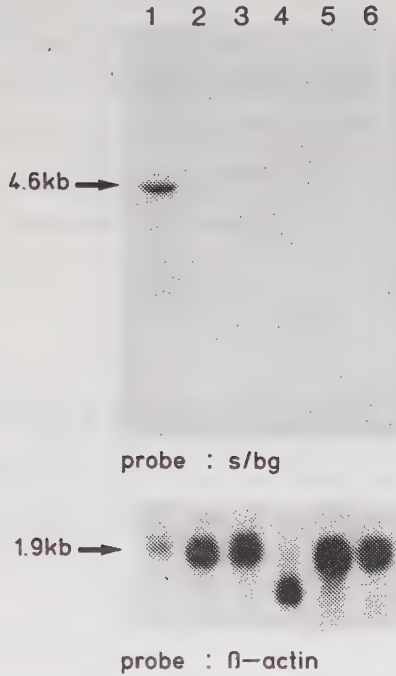


Abb.20. Northern Analyse von GesamtRNA aus verschiedenen Woodchuck Organen:
1: Leber, 2: Milz, 3: Niere, 4: Herz, 5: Lunge, 6: intestinales Gewebe.
Zusätzliche Hybridisierung mit β -Actin zeigt die gleichmässige Beladung des Gels.

Die Sequenz des s/bg Fragments wurde mit Hilfe der Kettenverlängerungsmethode nach Sanger (siehe Methodenteil) bestimmt und einer Computeranalyse unterzogen : ein Abgleich mit der "Los Alamos" Datenbank (Institut Pasteur) zeigt keinerlei signifikante Homologie mit einer schon bekannten Sequenz. Die Positionierung der Stoppkodons in allen drei Phasen (siehe Abb.21), und eine Untersuchung der Sequenz auf Spleiss-Signalsequenzen zeigte ferner, dass die Region s/bg keinen exon-ähnlichen offenen Leserahmen enthält. Da diese Sequenz jedoch exprimiert wird (siehe Northern Daten Abb. 19 und 20), muss es sich hier um 3' oder 5' nichtkodierende Regionen eines Gens handeln.

Abb.21. (Seite 57) Schematische Darstellung der Nukleotidsequenz des 2,3 kb SacI Fragmentes des rearrangierten c-myc Allels:

Dieses Fragment schliesst den Bruchpunkt des rearrangierten Allels ein, und enthält sowohl Sequenzen des l. c-myc Introns als auch die s/bg Region. Die Orientierung ist 5'→3', vertikale Striche markieren Stoppkodons des Plus Stranges (CONSR) und des Minus Stranges (ICONS) in allen drei Phasen.

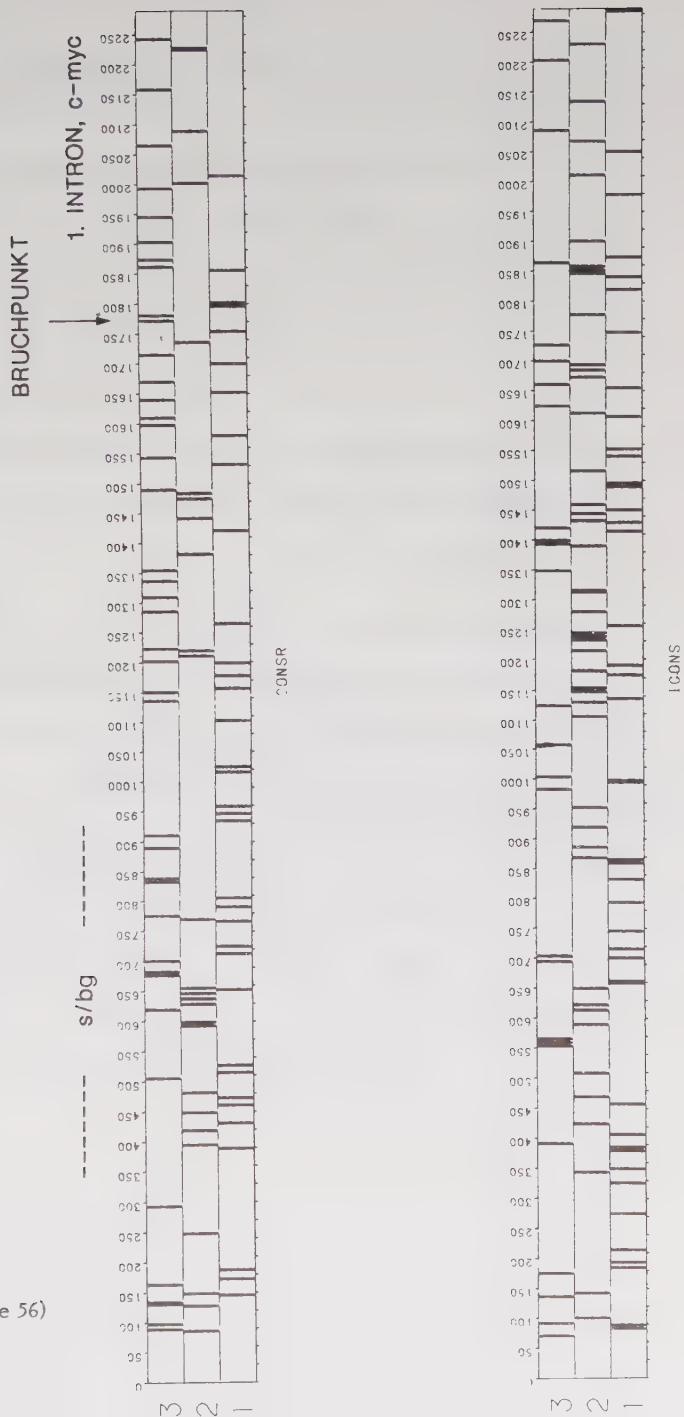


Abb.21.

(Legende Seite 56)

Die Daten der Kapitel 1 und 2 können wie folgt zusammengefasst werden :

- Von zehn Proto-Onkogenen, deren Transkriptionsniveau in Lebergewebeproben untersucht wurden, zeigte nur c-myc eine Überexpression in drei von neun Lebertumoren chronisch WHV - infizierter Woodchucks, sowie c-myc spezifische mRNA Moleküle anormaler Länge.
- In diesen drei Fällen (W64-, W74- und W93 HCC) hat ein Rearrangement des c-myc Proto-Onkogens ausserhalb seiner kodierenden Region stattgefunden.
- Im Fall des Tumors W64 HCC rearrangierte sich das c-myc Proto-Onkogen wahrscheinlich mit der nichtkodierenden Region eines leberspezifisch exprimierten Gens, wobei der Rekombinationspunkt im ersten Intron des c-myc Gens lokalisiert war.

3. WHV STATUS DER UNTERSUCHTEN GEWEBEPROBEN

3.1. Transkription und Replikation von WHV

Alle Viren der Hepadna Familie replizieren sich mit Hilfe eines 3,7 kb langen RNA Intermediats, dem sogenannten Prägenom. Die Anwesenheit dieses Transkripts und der 2,1 kb langen mRNA des S Gens zeugt von aktiver Replikation des Virus und der Expression seiner Gene (zur HBV Transkription siehe Will et al., 1987). Um den WHV-Status der in dieser Dissertation untersuchten Gewebeproben festzustellen, wurden alle "Northern-Membranen" noch einmal mit der gesamten Virussequenz hybridisiert.

Bei der WHV-Replikation entsteht eine Population aus DNA Fragmenten, die aus fertig synthetisierten viralen Genomen von 3,3 kb und aus wachsenden DNA Strängen verschiedener Länge kleiner als 3,3 kb besteht. Dieses Gemisch ist in der Southern Analyse als Schmier unterhalb 3,3 kb zu erkennen (siehe Abb.24, rechter Teil). Ein negatives Ergebnis der Northern Analyse hinsichtlich einer Virusreplikation kann deshalb mit Hilfe eines Southern Blots noch einmal überprüft werden. Alle untersuchten Gewebeproben wurden auch einer solchen Überprüfung unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

GEWEBEPROBE	WHV-REPLIKATION		ANORMALE WHV TRANSKRIPTION
	Northern Analyse	Southern Analyse	
W43 NT	-	(+)	-
W43 T	-	-	-
W44 NT	+	+	-
W44 T	-	(+)	-
W64 NT	+	+	-
W64 T	-	-	+
W74 NT	+	+	-
W74 T	-	-(+)	+
W93 NT	+	+	-
W93 T	(+)	(+)	+
W94 NT	+	+	-
W94 T	-	-	-
W97 NT	+	+	-
W97 T	(+)	(+)	-
W98 NT	+	+	-
W98 T	-	-	-
W418 NT	-	(+)	-
W418 T	-	-	-
W81	+	+	-
W120	+	+	-
W20	-	-	-
W101	-	-	-

Tabelle 1 : WHV Status der untersuchten Gewebeproben.

NT: nichttumoraler Teil, T: HCC Gewebe, +: Replikation, (+): schwache Replikation, -: kein Hinweis auf Replikation. W81 und W120 sind chronisch WHV-infizierte Tiere ohne Tumor, W20 und W101 sind gesunde Tiere. Anormale WHV Transkription (+ bei W64T, W74T und W93T) bedeutet, dass mRNA Moleküle nachgewiesen werden, die aufgrund ihres Molekulargewichtes nicht während der Virusreplikation synthetisiert wurden.

Die Northern Analyse der WHV spezifischen Transkripte im nicht-tumoralen Lebergewebe der Woodchucks Nr. 64, 74 und 93 (NT in Abb.22) zeigt die Anwesenheit der normalen 2,1 und 3,7kb mRNAs. 5,6 und 6,9kb lange RNA Moleküle, die wahrscheinlich die Produkte eines mehrfachen Transkriptionsdurchlaufes eines Virus Genoms darstellen, sind als

schwache Banden noch erkennbar. W64 HCC zeigt WHV spezifische Transkripte von 2,3 und 4,7 kb, W74 HCC ein 3,4 kb mRNA Molekül. In W93 HCC werden Transkripte von 1,9, 2,0, 2,1 und 3,7 kb gefunden (T in Abb. 22), wobei die beiden letzten (2,1 und 3,7 kb) mit den Southern Daten einer schwachen Virusreplikation konsistent sind (Abb. 26).

W74 HCC zeigt keine 2,1 und 3,7 kb Transkripte, obwohl die Southern Analyse (Abb. 26a) auf Replikation hinweist. In anderen Regionen der W74 Tumorgewebeprobe werden nach Southern Analyse der DNA keine viralen Replikationsintermediate, sondern nur integrierte Sequenzen gefunden (nicht gezeigt).

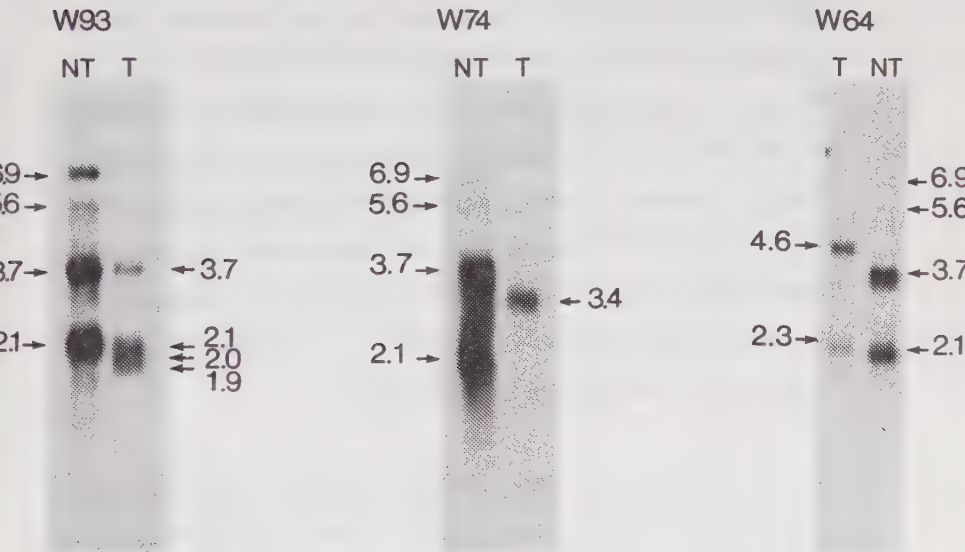


Abb.22. WHV-Transkription in W64, W93 und W74 HCC (T) und in den jeweiligen Nichttumortypen (NT):

5 µg (W64, W74) oder 10 µg (W93) poly-A⁺ RNA wurde nach Auftrennung in denaturierenden Agarosegelen auf Nitrozellulose übertragen und mit der 3,3 kb WHV Probe hybridisiert. Längenstandards wie in Abb. 4.

Diese Befunde lassen sich damit erklären, dass in der W74 Tumorgewebeprobe tumorale und chronisch infizierte, nichttumorale Zellen nebeneinander vorliegen. Die Anwesenheit sich replizierender Viren in den Fällen W44-, W97- und W93 HCC (Tabelle 1) könnte ebenfalls auf eine Inhomogenität der Gewebeproben zurückzuführen sein. Studien von Roggendorf und Mitarbeitern (persönliche Mitteilung) zeigten jedoch WHV Replikation in der Hälfte von 20 untersuchten Woodchuck Tumoren. Die Koexistenz von viraler Replikation und Integration könnte daher wesentlich häufiger vorkommen als bisher angenommen.

Es ist bemerkenswert, dass die HCC Gewebeproben W64, W74 und W93, in denen eine c-myc Aktivierung stattgefunden hat, auch anormale WHV Transkripte aufweisen. Da eine Southern Analyse der DNA dieser drei Tumoren (siehe Abschnitt 3.2) die Anwesenheit integrierter viraler DNA zeigte, könnten sie Kotranskripte zwischen viralen und benachbarten zellulären Sequenzen darstellen. Freytag von Loringhoven et al. (1985) und Ou et al. (1985) berichteten bereits von Kotranskripten zwischen viraler und zellulärer DNA in der humanen Hepatomzelllinie PLC/PRF/5. Ob diese Kotranskripte in ein Protein translatiert werden, und welche Funktion ein solches Protein haben könnte, ist völlig ungeklärt.

Der Fall W64 wurde genauer untersucht (siehe Abb. 23 a und b). Eine Northern Analyse mit 5 verschiedenen subgenomischen WHV Fragmenten zeigt, dass im nichttumoralen Teil die 3,7 kb mRNA das gesamte Virusgenom überdeckt, während das 2,1 kb Transkript Sequenzen der pre-S 2 Region, das S Gen und das X Gen enthält. Im Tumorteil lässt sich wie theoretisch gefordert (siehe Einführung) keine Expression des viralen

"Core" Gens nachweisen (Abb. 23a, Probe III). Das tumorspezifische 2,3 kb Transkript verhält sich wie die 2,1 kb mRNA in chronisch infizierter Leber, das 4,7 kb RNA Molekül enthält noch zusätzlich Sequenzen der pre-S 2 Region und ist mit ziemlicher Sicherheit aufgrund seiner Länge ein Hybrid zwischen integrierten viralen und zellulären Sequenzen (siehe auch Kap. 3.2.). Dieses mRNA Molekül ist nicht mit der c-myc spezifischen 4,7 kb mRNA (Abb. 4) identisch, wie die von Dr. J. Etienneble (Institut Pasteur) durchgeführten cDNA Klonierungsexperimente zeigen.

Die Positionen der Startstellen normaler viraler mRNA auf dem WHV Genom wurde mit Hilfe von S1 Nuklease- und Primerverlängerungsexperimenten an poly-A+ RNA aus W64 chronisch infizierter, nichttumoraler Leber bestimmt. Gespleisste RNA Moleküle, die durch diese Methoden ebenfalls nachgewiesen werden können, wurden nicht gefunden. Die Daten zu diesen Experimenten sind nicht im Einzelnen aufgeführt, ihr Endergebnis ist jedoch in Abb. 23b wiedergegeben : Die Haupttranskripte (2,1 und 3,7 kb) sind als dicke Pfeile um ein schematisiertes WHV Genom gezeichnet. Alle Transkripte besitzen ein gemeinsames 3' Ende, ca. 20 Nukleotide nach dem Polyadenylierungssignal

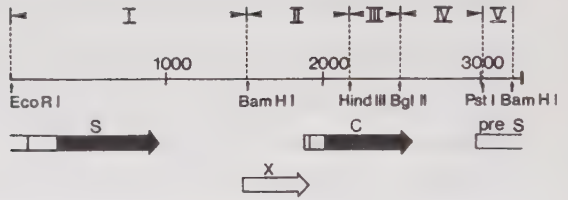
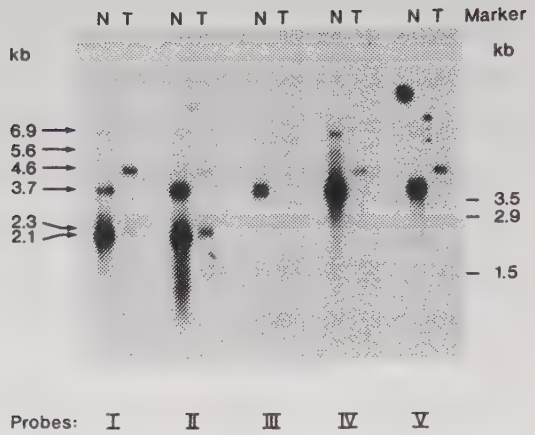
Abb.23. (Seite 64) WHV Transkription in W64 HCC(T) und Nichttumorteil (NT) und Position der normalen viralen Transkripte:

Herstellung der Northern Membranen wie in Abb. 22 beschrieben.

a): Hybridisierung mit subgenomischen WHV Fragmenten und schematische lineare Darstellung des WHV Genoms.

b): Startstellen der normalen viralen Transkripte in chronisch infizierter Leber (W64 NT) und Polyadenylierungsstelle. Zahlen geben die Position im viralen Genom an, Eco RI Schnittstelle = 1.

a)



b)

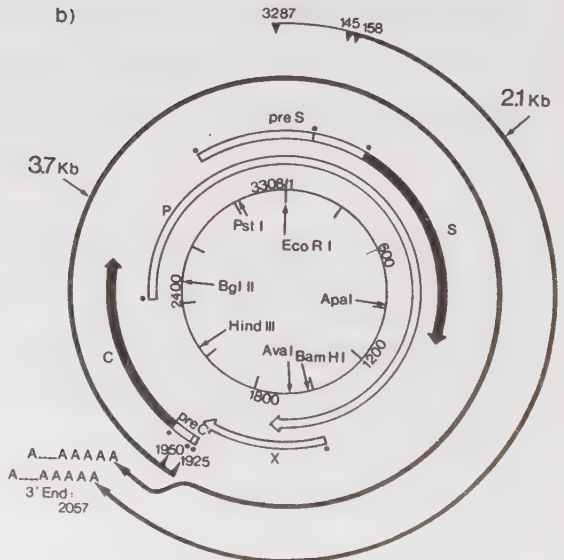


Abb. 23.

(Legende Seite 63)

in Position 2057. Eine minoritäre mRNA, deren Promotor unbekannt ist, mit einer Startstelle an der Position 3287 ist in der Fortsetzung des 2,1 kb Haupttranskripts als dünne Linie repräsentiert. Ein Promotor 5' der C Region initiiert die Synthese der 3,7 kb mRNA Moleküle in Position 1925 und 1950 (Abb. 23). Der interne Promotor der S Region ist in der Nähe der Eco RI Stelle lokalisiert und vom Typ "SV40 late" (Cattaneo et al., 1984). Er dirigiert den Transkriptionsstart der 2,1 kb mRNA Moleküle in Position 145 und 158 (Abb.23). Ein "TATA" Promotor ist unmittelbar 5' des Initiationskodons der pre-S1 Gens lokalisiert, aber in chronisch infizierten Zellen stumm. Er scheint in einigen Zelllinien aktiv zu sein, und dirigiert dann die Synthese einer 2,3kb mRNA (Daten hierfür aus Will et al. 1987, für HBV). Die Lokalisierung der mRNA Startstellen und die Daten der Northern Analyse ermöglichen die Zuordnung der tumorspezifischen Transkripte zu den ins Wirtsgenom der W64 Hepatomzellen integrierten viralen Sequenzen (siehe Kap. 3.2.).

3.2. Integrierte WHV Sequenzen

Verdaut man zelluläre DNA mit einem Restriktionsenzym und unterwirft sie dann einer Southern Analyse, so zeigen sich frei replizierende virale DNA als Schmier unterhalb 3,3 kb (siehe Kap. 3.1.), integrierte virale DNA jedoch als diskrete Banden, je nach Restriktionsenzym zumeist grösser als 3,3 kb. Das Ergebnis für die untersuchten neun Tumorgewebeproben ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

GEWEBEPROBE	INTEGRIERTE WHV SEQUENZEN
W43 T	-
W44 T	+
W64 T	+
W74 T	+
W93 T	+
W94 T	+
W97 T	-
W98 T	-
W418 T	< 1 Kopie/Zelle (geschätzt)

Tabelle 2 : Integrierte WHV Sequenzen in HCC Gewebe (T).
+: mehr als 1 Kopie pro Zelle (geschätzt), -: kein Hinweis auf integrierte Sequenzen.

3.2.1. W64 HCC

Die Southern Analyse der DNA aus W64 nichttumoraler Leber zeigt einen solchen Schmier unterhalb 3,3 kb und damit die Anwesenheit frei replizierender Viren an. Diskrete WHV spezifische Banden grösser als 3,3 kb sind in W64 HCC zu beobachten, und deuten auf integrierte virale Sequenzen hin (siehe Abb. 24).

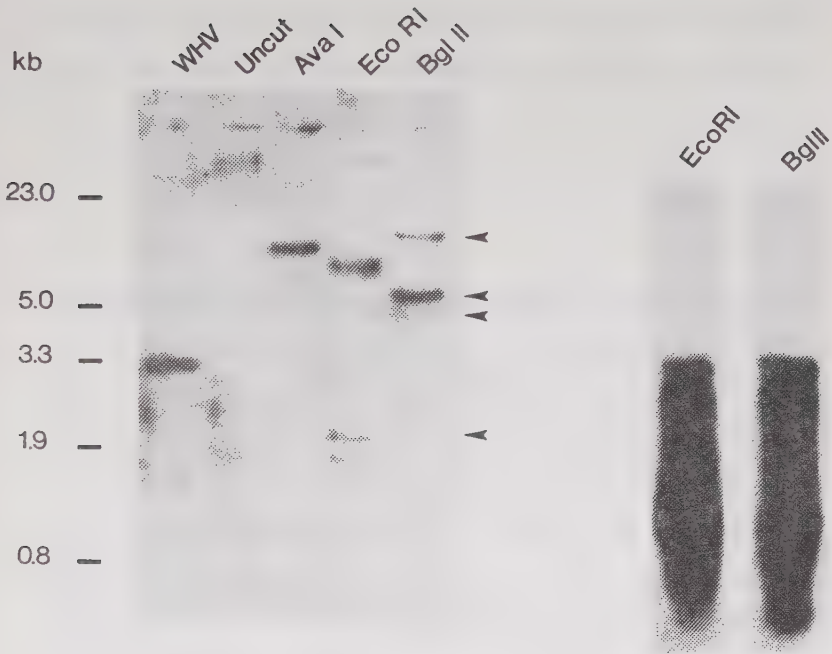


Abb. 24. Southern Analyse von DNA aus W64 HCC (linker Teil) und W64 nichttumoralet Lebergewebe (rechter Teil):

Je 35 µg DNA aus W64 HCC und Nichttumorteil wurden mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut, auf einem 0,8%igem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit dem gesamten WHV Genom hybridisiert. 50 pg der Probe wurden als Hybridisierungskontrolle mit auf das Gel gegeben (erste Spur links). Als Längenstandard wurde das Restriktionsfragmentgemisch Lamda-III verwendet. (Expositionszeit : 5 Tage).

Im BglIII Verdau sind Banden stärkerer und schwächerer Intensität zu beobachten (Abb. 24, Pfeilspitzen), was als multiple virale Integrationen mit unterschiedlicher Kopienzahl je Zelle interpretiert werden könnte. Da aber die Southern Analyse zweimal mit demgleichen Resultat wiederholt worden war (nicht gezeigt), ist eher anzunehmen, dass das Tumorgewebe hinsichtlich der WHV Integration monoklonal ist, und die BglIII Restriktionsfragmente unterschiedlich lange Virussequenzen enthalten, sodass die Hybridisierungssignale nicht einheitlich stark sind.

Zwei Einschränkungen müssen jedoch bei dieser Art der Analyse gemacht werden: Erstens wird bei weniger als 0,5 Kopien pro Zelle die Nachweisgrenze der Southern Blot Methode unterschritten, d.h. ein negatives Ergebnis schliesst die Existenz integrierter Sequenzen in z.B. einer von zehn Zellen eines oligoklonalen Tumors nicht aus. Zweitens können diskrete DNA Fragmente von hohem Molekulargewicht auch - in Tumoren allerdings sehr seltenen - Virus-Oligomere darstellen (Rogler et al., 1982). Eine sichere Aussage kann nur nach molekularer Klonierung integrierter Virussequenzen, wie sie für W64 HCC durchgeführt wurde, gemacht werden:

Nitrozellulosefilter mit ca. 1 Million rekombinanter Phagen der aus W64 HCC DNA erstellten Genbibliothek wurden mit der gesamten WHV Sequenz als Probe hybridisiert. Fünf WHV positive Klone: Nr.4, Nr.90, Nr.95, Nr.127 und Nr.130 wurden isoliert, amplifiziert, und ihre DNA einer Restriktionskartierung und einer Southern Analyse unterworfen. Die Insertionen der Phagen hatten eine Länge von 9 bis 13 kb, und enthielten keine c-myc spezifischen Sequenzen. Die Vorgehensweise der Kartierung

wurde bereits für die Klonierung des normalen und rearrangierten c-myc Gens beschrieben, und ist daher nicht noch einmal im Detail aufgeführt. Die Klone Nr.4, 90 und 95 bedecken eine, die Klone Nr.127 und 130 eine weitere Integrationsstelle des Virus. In Abb. 25 sind die jeweiligen Restriktionskarten und die mit WHV hybridisierenden Bereiche angegeben.

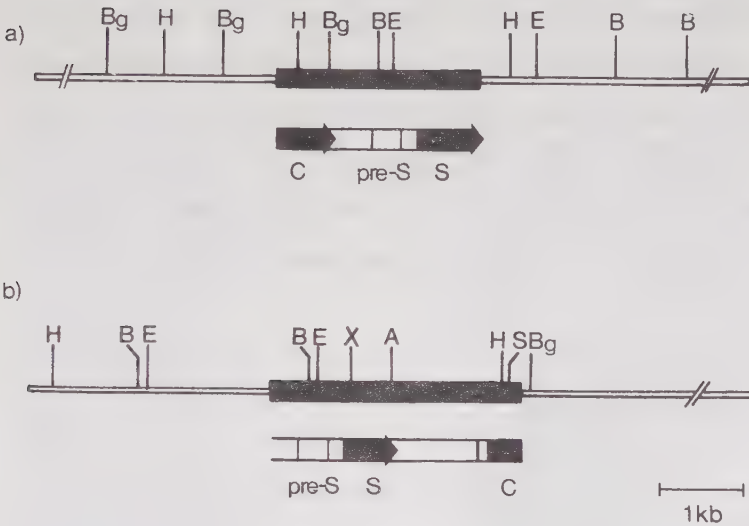


Abb.25. Restriktionkarte der beiden WHV Integrationsstellen (a und b): Zelluläre Sequenzen sind als offene Linie gezeichnet, mit WHV hybridisierende Regionen als schwarze Rechtecke, die Positionen der viralen Gene sind darunter angegeben. (Abkürzungen der Restriktionsenzymnamen wie in Abb. 4).

Die Grenzen zwischen viraler und zellulärer DNA können nur durch Sequenzierung präzise lokalisiert werden, und müssen hier ungenau bleiben. In nur einer der beiden Integrationsstellen ist das Polyadenylierungssignal TATAAA an Position 2057 (5' der HindIII Schnittstelle) konserviert worden (Abb.25b). Da nach den Daten der Northern Analyse die Sequenzen des "Core" Gens nicht mehr in den tumorspezifischen 2,3 und 4,7 kb Transkripten enthalten sind (Abb. 23), ist anzunehmen, dass der interne Promotor der S Region oder der pre-S1 "TATA" Promoter ihre Synthese initiieren (vgl. Kap.3.1.). Die Transkription wird für das 4,7 kb mRNA Molekül wahrscheinlich in den benachbarten zellulären Bereich fortgesetzt und dort terminiert, oder 5' der Integrationsstelle initiiert und im WHV C Gen in Position 2057 terminiert. Das 2,3 kb RNA Molekül könnte ein internes Transkript der zweiten viralen Integrationsstelle repräsentieren .

3.2.2. W74 und W93 HCC

Die für die in Kapitel 1 beschriebenen Southern Analysen verwendeten Nylonmembranen wurden durch Alkalibehandlung von den c-myc spezifischen Proben befreit, und nochmals mit dem WHV Genom als Probe hybridisiert. Diskrete Banden in Abb. 26a und b zeigen für W74 HCC und W93 HCC virale Integration. Ein "Schmier" unterhalb 3,3 kb im Nichttumorteil der W93 Gewebeprobe zeigt virale Replikation an. Eine separate Southern Analyse zeigte für den Nichttumorteil der W74 Gewebeprobe ausschliesslich virale Replikation, ist hier aber nicht aufgeführt. Legt man die beiden Autoradiogramme der WHV (Abb. 26) und c-myc Exon 1 Hybridisierungen (Abb.7 und 8) übereinander, so zeigt sich, dass die in der Abb. 26 mit Pfeilspitzen gekennzeichneten Banden in

beiden Hybridisierungen identisch sind, also sowohl c-myc als auch virale Sequenzen enthalten: Im HindIII Verdau von W74 HCC DNA ein 10 kb Fragment, in den Verdauen der W93 HCC DNA mit Eco RI, BglIII und HindIII Fragmente von 12, 3,2 und 8,6 kb. Eine ähnliche Übereinstimmung von Hybridisierungssignalen konnte für W64 HCC DNA nicht beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass zwar nicht im Fall W64, aber sehr wahrscheinlich in den Fällen W74 und W93 eine Integration viraler Sequenzen in der Nähe des rearrangierten c-myc Gens stattgefunden hat.

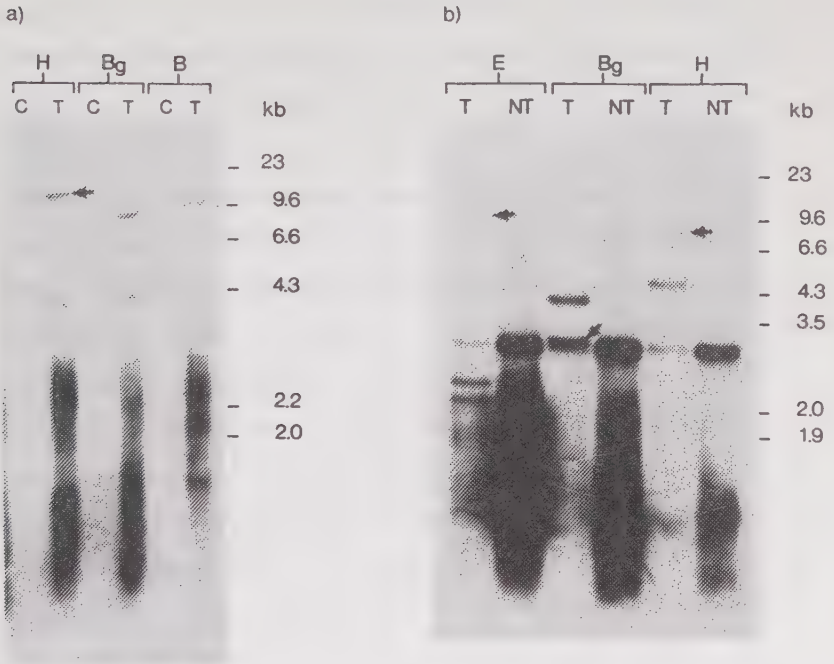


Abb. 26. Southern Analyse der DNA aus W74 (a) und W93 (b) Gewebeproben:

Herstellung der Membranen, Längenstandards und Expositionszeit wie in Abb. 7 und 8 beschrieben. T, HCC Gewebe, NT, nichttumorales Gewebe, C, Gewebe aus dem nichtinfizierten Tier W20.

Die Ergebnisse dieses Kapitels lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- In allen nichttumoralen Partien der Lebern der Woodchucks mit HCC liess sich mit Hilfe von Northern und Southern Analysen eine virale Replikation feststellen.
- Von den neun untersuchten Tumorgewebeproben enthielten sechs im Southern Blot detektierbare integrierte virale Sequenzen. Darunter waren auch diejenigen Fälle mit c-myc Rearrangement .
- In drei Fällen konnten keine integrierten viralen Sequenzen festgestellt werden.
- W64, W74 und W93 HCC Gewebeproben enthielten anormale WHV spezifische Transkripte, die höchstwahrscheinlich Kotranskripte zwischen integrierten viralen und benachbarten zellulären Sequenzen darstellen.
- Southern Analyse der integrierten WHV Sequenzen und Vergleich mit c-myc Hybridisierungen zeigte für W74 und W93 HCC, aber nicht für W64 HCC, eine Integration des Virus in der Nähe des c-myc Gens.

D. DISKUSSION

Epidemiologische Daten und Untersuchungen an Tiermodellen zeigen einen klaren kausalen Zusammenhang zwischen einer chronischen Infektion mit Hepatitis B Virus und der Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms (HCC). Als diese Dissertation begonnen wurden, lagen detaillierte Untersuchungen der ins Genom der Leberzelle integrierten viralen DNA und ihrer flankierenden zellulären Sequenzen vor, die jedoch keine Hinweise erbrachten, die zum Verständnis eines molekularen Mechanismus der Virus-induzierten Leberkarzinogenese hätten beitragen können. Ebenfalls ohne Ergebnis blieben Versuche, transformierende DNA Sequenzen aus HCC DNA oder aus den die Virussequenzen flankierenden Regionen zu isolieren (siehe Einführung).

Die Suche nach aktivierten Onkogenen in HCC Gewebe mit RNA Transfermethoden stellt einen alternativen Weg dar und repräsentiert den experimentellen Ansatz der vorgelegten Arbeit: Mit Hilfe einer Northern Analyse sollten Gewebeproben auf die Überexpression eines Proto-Onkogens oder die veränderte Länge seines Transkripts und so auf ihre Aktivierung hin untersucht werden. Zwar erfasst diese Methode nicht die Proto-Onkogene, deren Aktivierung nicht mit einer Überexpression oder einer Veränderung der mRNA einhergehen. Sie hat aber den Vorteil etwa gegenüber der Transfektion von "NIH 3T3" Mausfibroblasten, die ebenfalls nur einen Teil der aktivierten Onkogene nachweisen kann, rasch durchführbar und frei von Artefakten zu sein.

Die Verwendung von Gewebeproben garantiert, dass eine Situation in vivo untersucht wird, birgt aber andererseits die Gefahr der Inhomogenität in

sich. Besonders Tumorgewebeproben können neben Hepatozyten auch Zellen hämatopoietischen Ursprungs oder Bindegewebszellen enthalten. Dies kann zu Fehlinterpretationen der erhaltenen Daten führen. In Kultur gehaltene Zelllinien stellen als Alternative zwar homogenes Material dar, aus der Untersuchung dieses Materials gewonnene Daten lassen sich jedoch nicht auf die Vorgänge im lebenden Organismus übertragen.

Die Tumorentstehung ist ein zeitabhängiger Prozess. Resultate aus der Untersuchung einer Gewebeprobe, die zu einem bestimmten Zeitpunkt entnommen wurde, geben daher nur eine "Momentaufnahme" der Ereignisse wieder. Ein vollständiges Bild, welche molekularen Vorgänge der Entstehung eines Tumors zugrunde liegen, kann jedoch nur aus der Analyse vieler solcher "Momentaufnahmen" entstehen.

Tumorale und nichttumorale Gewebeproben von neun chronisch mit WHV infizierten Woodchucks wurden auf Integration und Replikation viraler Sequenzen, sowie auf Proto-Onkogen Aktivierung hin untersucht. In allen nichttumoralen Partien konnte eine Virusreplikation nachgewiesen werden und in sechs Tumorgewebeproben ins Genom der Leberzelle integrierte virale Sequenzen. Nur in den Fällen W64 HCC, W74 HCC und W93 HCC wurde die Aktivierung eines Proto-Onkogens, nämlich des c-myc Gens gefunden. Diese drei Fälle wurden daher in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht.

In W64 HCC, in W74 HCC und in W93 HCC lag der Aktivierung ein Rearrangement des c-myc Gens ausserhalb seiner kodierenden Region zugrunde. Die Überexpression um einen Faktor 5-50 verglichen mit der

Expression in Nichttumorgewebe und die Produktion von Transkripten anormaler Länge konnten in allen drei Tumoren nachgewiesen werden. Statt der normalen 2,3 kb c-myc mRNA wurden im Tumor W93 Transkripte von 2,3 -2,5 kb, in W74 HCC von 5,6 kb und in W64 HCC von 2,0, 4,7 und 5,8 kb gefunden. Ausserdem fanden sich in allen drei Fällen in chromosomale DNA integrierte virale Sequenzen und WHV spezifische mRNA Moleküle anormaler Länge, die wahrscheinlich von integrierten WHV Sequenzen transkribiert worden waren.

In W64 Tumorzellen hat sich ein c-myc Allel ohne direkte Einwirkung von WHV mit der nichtkodierenden Region eines leberspezifisch exprimierten Gens rearrangiert. Der Bruchpunkt liegt im 1. Intron des c-myc Gens. Die c-myc Rekombinationen in W93 HCC und W74 HCC sind wahrscheinlich auf Insertionen der Virus DNA in der Nähe des c-myc Gens zurückzuführen.

c-myc Transkription in W93, W74 und W64 Tumorgewebe :

Eine Dominanz des Promotors P₁ über P₂ oder zumindest eine Gleichwertigkeit beider Promotoren wurde schon bei mehreren Plasmazelltumoren der Maus beschrieben (Yang et al., 1985). Solch ein "Promoter-Shift" ereignet sich dann, wenn das Rearrangement 5' des ersten Exons stattgefunden hat. Northern und Southern Daten zeigen eine sehr ähnliche Situation für W93 HCC. In solchen Maus Plasmazelltumoren wie auch in W93 HCC liegt das Expressionsniveau der c-myc Transkripte um einen Faktor 5-10 höher als in normalen Plasmazellen oder nichttumoraler Leber. Eine Kotranskription zwischen c-myc und WHV Sequenzen - in Analogie zu Avian Leukosis Virus (ALV) und c-myc in Bursa Lymphomen bei Vögeln(siehe Einführung) - ist nicht anzunehmen, da die c-

myc und WHV Transkripte in diesem Fall verschiedene Länge haben.

Transkripte, die wesentlich länger als 2,3 kb sind, wurden von Taub et al. (1984) in einem Burkitt Lymphom beschrieben. In diesem Fall fand eine Duplikation des ersten c-myc Intron/Exon Bereiches statt. Man könnte spekulieren, ob sich ein derartiges Ereignis im W74 HCC abgespielt hat. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Fusion des c-myc Gens mit einem aktiven DNA Abschnitt, welcher Promotoren enthalten müsste, die über P₁ und P₂ dominieren, da in W74 HCC keine normale 2,3 kb m-RNA gefunden wurde. WHV Sequenzen können diese Rolle nicht übernehmen, da WHV und c-myc spezifische mRNA Moleküle auch hier unterschiedliche Länge aufweisen.

Kürzere Transkripte, die nach Rekombination im 1. Intron von dort lokalisierten kryptischen Promotoren aus synthetisiert werden, sowie längere Kotranskripte zwischen c-myc und Partnersequenzen, wurden unter anderem in Burkitt Lymphom Zelllinien und Plasmazytomen der Maus beobachtet (Stanton et al., 1983, Eick et al., 1985). Eine ähnliche Situation ist in W64 HCC mit einer 2,0 kb c-myc mRNA und 4,7 und 5,8 kb Kotranskripten anzutreffen.

Hybridisierungsexperimente mit c-myc Exon 1 und 2 zeigen zumindest für W74 HCC und W64 HCC, dass das normale nichtrearrangierte c-myc Allel in Tumorzellen nicht transkribiert wird, da keine normale 2,3 kb mRNA nachweisbar war. Diese Suppression der Transkription des nicht rearrangierten Allels, ebenfalls von mehreren Autoren in Burkitt Lymphomen und anderen B-Zell Tumoren beschrieben (Ar-Rushdi et al., 1983, Nishikura et al., 1983), zeigt, dass die Transkription des normalen

und rearrangierten Allels in derselben Zelle auf verschiedene Weise reguliert werden. P. Leder und Mitarbeiter (1983) schlugen hierfür ein Modell vor, worin das c-myc Genprodukt seine eigene Synthese steuert, indem es in Wechselwirkung mit den regulativen Sequenzen des ersten Exon/Intron Bereiches tritt. Eine konstitutive und erhöhte Expression des c-myc Proteins ausgehend von einem im 1. Intron rearrangierten Gen könnte so die Aktivität des nicht rearrangierten Allels in derselben Zelle stark mindern. Die Expression des rearrangierten Allels bliebe davon unberührt, da ihm die Regulatorsequenzen fehlen. Verschiedene Methylierungsgrade des normalen und veränderten Allels könnten ebenfalls eine Rolle spielen (Dunnick et al., 1985).

Die Überexpression des rearrangierten c-myc Allels lässt sich dadurch erklären, dass "Dehancer-" oder "Attenuatorsequenzen" (siehe Einführung) durch die Rekombination eliminiert oder verändert, oder neue Regulatorsequenzen 5' des c-myc Gens plaziert wurden. Bei verkürzten mRNAs, wie das 2,0 kb Transkript in W64 HCC, kann die Überexpression aber auch auf eine grössere Stabilität des RNA Moleküls und eine damit verbundene grössere Halbwertszeit zurückzuführen sein (Eick et al., 1983).

Obwohl die Exon 1 Probe gut mit den tumorspezifischen mRNA Molekülen in W93 HCC und W74 HCC reagiert, hybridisieren die normalen c-myc Transkripte in W93 und W64 Nichttumorleber fast überhaupt nicht und in W74 nur schwach mit den Sequenzen des ersten Exons. Vermutlich existiert neben den normalen 2,3 kb mRNAs unter P2 Kontrolle eine weitere, stärkere mRNA Population, deren Synthese im ersten Intron

initiiert wird und die Sequenzen dieser nichtkodierenden Region enthält, um die Länge von 2,3 kb zu erreichen. Diese Annahme wird durch Berichte von Ray und Mitarbeitern (1987) gestützt : Im Milzgewebe von Mäusen, die mit dem Komplex des Leukämie verursachenden Friend Virus infiziert waren, wurden "normale" 2,3 kb c-myc Transkripte gefunden, die im 1. Intron initiiert wurden. Die Existenz solcher mRNA Moleküle wird von Ray und Mitarbeitern mit der Ausbildung eines "präneoplastischen" Gewebezustands in Verbindung gebracht. WHV infiziertes Lebergewebe ist unter dem Druck einer starken Virusreplikation und einer andauernden Lyse der Zellen durch die cytotoxische Immunantwort ständig gezwungen sich zu regenerieren und könnte ein solches "präneoplastisches" Stadium repräsentieren.

Rekombination des c-myc Genes und Tumorentstehung für W64 HCC :

Avian Leukosis Viren (ALV) integrieren als Provirus 5' des zellulären c-myc Proto-Oncogens, wobei Promotor/Enhancersequenzen im viralen LTR an die Stelle der regulativen Sequenzen plaziert werden (Payne et al., 1982). Ein solcher direkter Aktivierungsmechanismus durch WHV Insertion ist für den Fall W64 HCC ausgeschlossen, da keine viralen Sequenzen im rearrangierten c-myc Allel bis zu 5 kb 5' des Bruchpunktes gefunden wurden. Die Aktivierung des c-myc Gens hat mit ziemlicher Sicherheit in W64 HCC durch chromosomale Translokation einer zellulären Partnersequenz mit dem Proto-Onkogen stattgefunden. Hierin ähneln diese Fälle stark den in Burkitt Lymphomen vorkommenden c-myc Rekombinationen mit einem der drei Immunglobulin Loci, die in B Lymphozyten aktiv sind. Das Resultat ist eine konstitutive Expression des Onkogens (siehe Einführung). Die Rekombinationsstellen liegen dabei von

einigen Ausnahmen abgesehen ebenfalls 5' der kodierenden Region. Der molekulare Mechanismus solcher Translokationen ist noch weitgehend unklar. Tsujimoto (1985) und Mitarbeiter stellten jedoch die Hypothese auf, dass diese Translokationen das Ergebnis einer fehlerhaften Rekombination der "Variable (V)", "Diversity (D)" und "Joining (J)" Regionen des Immunglobulin Locus sind. Nach Alt und Baltimore (wiedergegeben in Tonegawa, 1983) sind sogenannte Heptamer/Nonamer Konsensussequenzen, getrennt durch 23 bp (D-Region) oder 12 bp (J Region), Angriffsziele spezifischer Enzyme, die das "Joining" bewerkstelligen (Tonegawa et al., 1983). Die Existenz einer ähnlichen Heptamer/Nonamer Signalsequenz im translozierten Allel in der Nähe eines c-myc Rekombinationspunktes führte Tsujimoto zu der Annahme, dass der Immunglobulin spezifische Rekombinationsmechanismus in Abweichung seiner normalen Funktion für das Onkogenrearrangement verantwortlich sein könnte.

Tatsächlich liegt im ersten Woodchuck c-myc Intron eine Heptamer/Nonamer ähnliche Sequenz in der Nähe des Bruchpunktes in W64 HCC (in Abb.165 unterstrichen). Eine reziproke Region im Partnerallel konnte jedoch bis 200 bp 3' des Bruchpunktes nicht gefunden werden (nicht gezeigt). Da ausserdem in der Bruchpunktregion keine Homologien zur Immunglobulinsequenzen nachgewiesen werden konnten, ist die Modellvorstellung von Tsujimoto und Mitarbeiter auf das hier beschriebene c-myc Rearrangement nicht anwendbar. Vorstellbar wäre, dass generell illegitime Rekombinationen zwischen "aktiven" Abschnitten mit offener Chromatinstruktur stattfinden. Immunglobulingene, wie auch die stark transkribierten s/bg Sequenzen in W64 Leberzellen, wären dafür geeignete Kandidaten.

Das Tetranukleotid GGAT, das am Bruchpunkt des c-myc Proto-Onkogens in W64 HCC liegt (siehe Abb. 17), könnte andererseits die Zielsequenz einer noch unbekannten "Rekombinase" darstellen, welche ein Rearrangement des c-myc Gens katalysiert. Piccoli et al. (1984) berichteten schon von einer Tetranukleotidsequenz GGAG, die an der Rekombinationsstelle mehrerer rearrangierter c-myc Gene in Maus Plasmazytomen vorkommt.

Wie HCC mit einer WHV bzw. HBV Infektion in Verbindung gebracht wird, so wird die Rolle von Epstein Barr Virus (EBV) in der afrikanischen Form des Burkitt Lymphoms diskutiert. Diese hochendemische Variante stellt ein Beispiel eines menschlichen Tumors dar, der sich in mehreren Schritten entwickelt : virale Infektion (EBV), c-myc Rearrangement und Aktivierung eines weiteren Onkogens der "ras" Gruppe, dessen Sequenz weder mit c-myc noch mit EBV verwandt sind (wiedergegeben in Klein et al., 1985). Das zur Herpesvirusgruppe gehörende EBV immortalisiert B-Zellen und verurteilt sie somit zu ständigem Wachstum und Zellteilung. Dieser Immortalisierungsmechanismus ist zum Teil auf die Etablierung einer Selbststimulierung durch B-Zell Wachstumsfaktor (BCGF) (Klein et al., 1985) zurückzuführen.

Experimentelle Daten über einen immortalisierenden Effekt einer Hepadna Virus Infektion auf Hepatozyten liegen dagegen nicht vor. Leberzellen, die HBV replizieren und das virale "Core" Antigene (HBcAg) auf der Zelloberfläche tragen, werden jedoch wahrscheinlich von cytotoxischen T-Zellen erkannt und zerstört. Da die lysierten Gewebepartien sofort durch nachwachsendes Lebergewebe ersetzt

werden, provozieren HBV und WHV indirekt ebenfalls vermehrte Zellteilungs- und Wachstumsprozesse. Die Wahrscheinlichkeit von Chromosomen-Aberrationen steigt aber mit der Anzahl der Zellteilungen, und damit auch das Risiko eines c-myc Rearrangements. Hinzu kommt für die Hepatitis Virus infizierte Zelle die Integration des viralen Genoms in die chromosomale DNA, deren Anfälligkeit für illegitime Rekombinationen dadurch noch erhöht werden könnte (Rogler et al., 1987, D. Simon, persönliche Mitteilung). Ein c-myc Rearrangement könnte sich im Fall von W64 HCC als zweiter genetischer Effekt, wie in Burkitt Lymphomen vor dem Hintergrund einer längeren präneoplastischen Periode viraler Infektion und chronischer Stimulation der "Targetzellen" zur Teilung, ereignet haben. Die durch das Rearrangement etablierte konstitutive c-myc Expression befreit die EBV-infizierten B-Zellen von ihrer Abhängigkeit von BCGF und schreibt so die Immortalisierung fest. Über welchen molekularen Mechanismus das c-myc Genprodukt eine Immortalisierung von WHV-infizierten Hepatozyten im Fall W64 erreicht ist völlig unklar. Wahrscheinlich ist, dass der HCC Ausbildung zunächst eine Selektion derjenigen Zellen vorausgeht, die das virale c-Gen nicht mehr exprimieren und damit nur noch schwache oder keine Virusreplikation aufweisen. Eine c-myc Aktivierung würde solchen Zellen eine vom Regenerationsstatus unabhängige Teilungskompetenz sichern und ihnen so einen weiteren Selektionsvorteil verschaffen. Zur endgültigen Ausbildung des tumoralen Phänotyps, d.h. zur Transformation der immortalisierten Zelle in eine Tumorzelle, ist c-myc jedoch auf einen Kooperationspartner angewiesen (Land et al., 1983, Sinn et al., 1987).

Dieser könnte durch die in DNA von Burkitt Lymphomen nachgewiesenen aktivierten Gene "ras" oder "Blym" (wiedergegeben in Klein et al., 1985) repräsentiert werden. Das von Ochiya und Kollegen aus humaner HCC DNA isolierte Gen "lca", das ebenfalls zur ras Onkogen Gruppe gehört, wäre aber ebenfalls ein guter Kandidat (Ochiya et al., 1986).

Ob und in welcher Weise die in W64 HCC, aber auch in W74 HCC und W93 HCC nachgewiesenen, anormalen WHV Transkripte zur Tumorentstehung beitragen, ist unklar. Nur die Identifizierung eventuell kotranskribierter zellulärer Sequenzen durch Klonierung und Sequenzierung der c-DNA dieser Transkripte kann zu weiteren Erkenntnissen führen. Ob das Produkt der viralen X Region, welche in W64 HCC exprimiert wird, als Transaktivator die Expression anderer, für die Tumorentstehung kritischer Gene beeinflusst, bleibt Spekulation.

Rekombinationen des c-myc Gens und Tumorentstehung für W74 und W93HCC :

Im Gegensatz zu W64 HCC hat in W74 und in W93 HCC wahrscheinlich eine Insertion von WHV oder eines subgenomischen Fragmentes in der Nähe des c-myc Gens stattgefunden. In der Literatur sind zahlreiche Beispiele solcher Proto-Onkogenaktivierungen durch virale Insertion beschrieben: z.B. Avian Leukosis Virus (ALV) für c-myc in Bursa Lymphomzellen und für c-erb-B in tumoralen Erythroblasten von Vögeln, oder Murin Leukemia Virus (MLV) für c-myb in Lymphosarcomen der Maus. In fast allen Fällen findet eine Kotranskription von viralen und Onkogensequenzen statt. ALV kann 5' oder 3' von c-myc integrieren, d.h. entweder dirigieren die Promotoren des viralen LTR die Synthese einer

Hybrid mRNA, oder ALV Enhancersequenzen beeinflussen in einer Trans-Wirkung die c-myc Expression. Jedesmal wird eine konstitutive Expression des Onkogens erreicht (wiedergegeben in Nusse, 1986).

In keiner der beiden Tumorgewebeproben konnte nach bisherigen Daten Virus-Onkogen Hybrid mRNAs nachgewiesen werden. Dieser Befund deutet eher auf eine c-myc Aktivierung durch WHV Enhancer- und/oder Transaktivatorsequenzen hin. Um die genaue Wirkung der viralen Sequenzen auf c-myc verstehen zu können, sind jedoch neben der molekularen Klonierung der veränderten c-myc Allele für W74 HCC und W93 HCC noch weitere Experimente notwendig.

ALV und auch MLV gehören nicht zu den akut transformierenden Retroviren, d.h. sie enthalten kein Onkogen und die Ausprägung des tumoralen Phänotyps tritt erst nach einer postinfektiösen Latenzzeit ein. Hierin ähneln sie den Hepadna Viren. Wahrscheinlich hat auch in W74 HCC und W93 HCC, wie schon für W64 HCC gefordert, ein weiteres Ereignis in der Zelle stattgefunden, welches dazu beiträgt die durch c-myc immortalisierten Zellen in maligne Zellen zu transformieren.

Die aufgezeigte Homologie der verschiedenen Stadien der Tumorausbildung zwischen Lymphomen oder Leukämien und Hepatitis Virus induzierten HCC bleibt eine Spekulation. Die Tatsache, dass diese Tumore sich von so unterschiedlichen Zellen, wie prä-B Lymphozyten, Erythroblasten, Bursa Zellen und ausdifferenzierten Hepatozyten ableiten, aber dennoch rearrangierte c-myc Gene aufweisen, unterstreicht aber

eine generelle Korrelation des Phänomens der c-myc Aktivierung mit der Ausbildung von Tumoren.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Resultate sind das Ergebnis einer molekularbiologischen Untersuchung. Sie lässt immunologische, biochemische und zellbiologische Phänomene ausser acht, und stellt daher nur einen Aspekt der Onkogenese dar. Schon in der Einführung wurde dargelegt, dass dem Prozess der Tumorentstehung mehrere Ereignisse, die synergistisch miteinander kooperieren, zugrunde liegen. Die Entstehung Hepatitis Virus induzierter Leberkarzinome ist sicher verschiedenen Prozessen zuzuschreiben, da so unterschiedliche Phänotypen wie Virus Integration mit intakten oder rearrangierten c-myc Genen oder vollständige Abwesenheit viraler Sequenzen beobachtet werden.

In einem dieser Prozesse ist jedoch die c-myc Aktivierung durch direkte oder indirekte Einwirkung des Hepatitis Virus eine notwendige Etappe.

E. MATERIAL UND METHODEN

1.MATERIAL

1.1. Chemikalien

Acrylamid	Serva
Adenosintriphosphat	Boehringer
Agarose	Sigma
Ampicillin	Lab. Bristol, Paris
Ammoniumpersulfat	Prolabo, Paris
Bacto-Agar	Difco
Bacto-trypton	Difco
Borsäure	Merck
Bromophenolblau	Merck
Trypton	Difco
Caesiumchlorid	Merck
Dimethylformamid	Merck
Dithiothreitol	Serva
Deoxyribonucleosidtriphosphate	Boehringer
Dideoxyribonucleosidtriphosphate	Boehringer
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Pharmacia
Glyoxal	Merck
Hefeextrakt	Difco
Isopropylthiogalaktosid	Serva

N,N'-Methylenbisacrylamid	Serva
Polyethylenglycol 6000	Merck
Polyvinylpyrrolidon	Serva
Spermidin	Sigma
Rinderserumalbumin	Sigma
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Merck
Thymidin	Boehringer
5'-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid	Serva
Xylencyanol	Serva

Alle weiteren verwendeten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad von den Firmen Merck, Sigma und Serva bezogen.

1.2. Enzyme

Restriktionsenzyme	BRL, Amersham, Biolabs
DNA Polymerase I "Klenow-fragment"	Amersham
Proteinase K	Boehringer
RNAse A	Boehringer
S1 Nuklease	Sigma (Type III)
Exonuklease VII	BRL
AMV Reverse Transkriptase	Life Sciences, Amersham
Polynukleotidkinase	Boehringer, Amersham
T4 DNA Polymerase	Amersham
Alkalische Phosphatase	Boehringer

1.3. Radiochemikalien

alpha-(^{32}P) dCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham
alpha-(^{32}P) dTTP (3000 Ci/mmol)	Amersham
gamma-(^{32}P) dATP (1000 Ci/mmol)	Amersham
alpha-(^{35}S) dATP (400 Ci/mmol)	Amersham

1.4. Sonstige Materialien

Amberlite MB1	Biorad
3MM Chromatographiepapier	Whatman
Nitrocellulose, 0,45 μm Porengrösse	Schleicher & Schüll
5 cm Säulen DEAE 52-Cellulose ("Elutip")	Schleicher & Schüll
Nitrozellulose Filter für Plaque Test	Schleicher & Schüll
"Hybond-N"-Nylon Membranen	Amersham
Röntgenfilm X-AR5	Kodak
Röntgenfilm	Fuji
Lambda-DNA	Boehringer
Φ x-174 Phagen DNA	BRL
DNA aus Lachssperma	Serva
Extrakte zur in vitro Verpackung von Lambda-DNA	Amersham
Standard Primer für Sequenzierung	Amersham
Oligo-dT Cellulose	Pharmacia
Sephadex G75	Pharmacia
Biogel P10	Biorad

1.5. Bakterienstämme, Bakteriophagen und Plasmide

<u>E.coli</u> LA 101	(Dr. C. Bréchet, Paris)
<u>E.coli</u> DH 1	(Dr. M.A. Buendia, Paris)
<u>E.coli</u> TG1	Amersham
Lambda L47.1	(Dr. C. Bréchet, Paris)
M13 mp8	Amersham
M13 tg 130	(Dr. M.L. Michel, Paris)
pBR322	Amersham
pGEM 1	Promega-Biotec
pGEM 2	Promega-Biotec
pBH20 (WHV)	(Dr. W. Ogston, Chicago)
pcMyc 54	(Dr. K. Marcu, Stony-Brook)

1.6. Tiere, Gewebeproben

Alle in dieser Dissertation untersuchten Gewebeproben von WHV-infizierten oder gesunden Woodchucks (Marmota monax) wurden von Prof. Dr. C. Trépo, Laboratoire des Hépatites (INSERM U.271), UER Alexis-Carrel, rue Guillaume Paradin - 69372 Lyon Cédex 3, Frankreich, entnommen. Alle Woodchucks wurden in Lyon unter der Aufsicht von Prof. Dr. C. Trépo gehalten.

1.7. Medien

LB Medium :	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	auf 1 Liter, pH 7,3	
TB Medium :	Bactotrypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	2,5 g
	MgSO ₄	2,64 g
	auf 1 Liter, pH 7,2	
TB Weichagarose :	TB Medium + 6 g Agarose/Liter (6% Agarose)	
T Medium :	Bactotrypton	10 g
	NaCl	2,5 g
	MgSO ₄	2,64 g
	auf 1 Liter, pH 7,2	
T Weichagarose :	T Medium + 6 g Agarose/Liter (6% Agarose)	
2xYT Medium :	Bactotrypton	16 g
	Hefeextrakt	10 g
	NaCl	5 g
	auf 1 Liter	
Platten	Entsprechendes Medium + 12 g Agarose/Liter	

1.8. Allgemein verwendete Puffer und Reagenzien

TE-Puffer :	1 mM EDTA
	10 mM Tris/HCl pH 7,4

TAE-Puffer :	40 mM Tris	
	20 mM Na-azetat pH 8,1	
	2 mM EDTA	
10xTBE-Puffer :	108 g Tris	
	55 g Borsäure	
	9,3 g $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	
20xSSC :	3 M NaCl	
	0,3 M Trinatriumcitrat pH 7,0	
Phenol :	Für alle Extraktionen wurde,	
	wenn nichts anders vermerkt, TE-	
	Puffer gesättigtes Phenol	
	verwendet.	
CHCl_3 :	CHCl_3 : Isoamylalkohol 24:1	
50 x Denhardt'sche Lösung :	5% Ficoll	
	5% Polyvinylpyrrolidon	
	5% Rinderserumalbumin	
63 B1 per Liter :	KH_2PO_4	13,6 g
	MgSO_4	0,2 g
	$(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$	2 g
	FeSO_4	1 ml (50 mg/100 ml H_2O)
	Vitamin B1	2 ml (50 mg/100 ml H_2O)
		pH 7,0
Phagenpuffer :	63 B1 10 fach in H_2O verdünnt	
10xLigase Puffer	600 mM Tris/HCl pH 7,5	
	60 mM MgCl_2	
	100 mM DTT	
	10 mM ATP	

2.METHODEN

2.1. DNA Isolierung

2.1.1. Isolierung chromosomaler DNA :

Gefrorene Gewebestücke (500mg-Ig) wurden in einem Stahlmörser in flüssigem N₂ pulverisiert und in 5-10 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,5% SDS, 100 µg/ml Proteinase K) aufgenommen. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurde das Lysat zweimal mit Phenol und einmal mit CHCl₃ ausgeschüttelt und 3-4 h bei 4°C gegen TE Puffer dialysiert. Zur Hydrolyse der enthaltenen RNA wurde mit RNase A (50 µg/ml Endkonzentration), die zuvor 5 min auf 100°C erhitzt wurde, 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer weiteren Phenol- und CHCl₃-Extraktion wurde über Nacht bei 4°C gegen TE-Puffer dialysiert. Die DNA Lösung wurde bei 4°C aufbewahrt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Absorption bei 260 nm gemessen.

2.1.2. Schnellpräparation von Plasmid DNA :

Bakterien wurden in 5 ml Kulturen über Nacht wachsen gelassen, durch Zentrifugation sedimentiert und in 200 µl 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose aufgenommen. Es wurden 400 µl alkalische SDS Lösung zupipettiert und 10 min im Eisbad stengelassen.

Nach Zugabe von 200 µl 5 M Kaliumazetatlösung pH 4,8 und weiteren 10 min im Eisbad wurde die Suspension abzentrifugiert, der Überstand einmal mit Phenol und einmal mit CHCl₃ ausgeschüttelt und mit 1/2 Volumen Propanol-2 ausgefällt. Der Niederschlag wurde in 200 µl 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl aufgenommen, mit 2 Vol Ethanol präzipitiert

und in 100 µl TE Puffer gelöst ; 10 µl reichten für eine gelelektrophoretische Analyse aus. Eine Präparation ausgehend von einer 50 ml Kultur lieferte genügend Material für alle in dieser Dissertation angewandten Verfahren.

2.1.4. Präparative Isolierung von Lambda DNA :

1 l LB-Medium, welches 10 mM $MgCl_2$ enthielt, wurde mit ca 5×10^8 Zellen von E.coli und 3×10^7 Phagen angeimpft und 12-16 h bei 37°C unter starkem Schütteln wachsen gelassen. Nach Zugabe von 2 ml $CHCl_3$ wurden Bakterien und Zelltrümmer abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit NaCl und Polyethylenglykol 6000 (29g/500ml beziehungsweise 50g/500ml Endkonzentration) versetzt und 1 h bei 4°C belassen.

Phagen wurden durch Zentrifugation sedimentiert (9000 rpm, Sorvall, GSA Rotor, 20 min, 4°C) und in 6-8 ml Phagenpuffer aufgenommen. Nach Ausschütteln mit $CHCl_3$ wurde die Phagensuspension auf einen $CsCl$ -Stufengradienten gegeben der aus $CsCl$ Lösungen der Dichte 1,3, 1,5 und 1,7 g/ml in Phagenpuffer bestand, und zentrifugiert (SW41 Rotor, 2,5 h, 20°C, 30.000 rpm). Die bei 1,5 g/ml bandierenden Phagen wurden mit einer Nadel abgezapft, mit $CsCl$ auf eine Dichte von 1,5 g/ml eingestellt und erneut zentrifugiert (22 h). Nach Isolierung der Phagenbande wurde Proteinase K (500 µg/ml), SDS (0,5%), EDTA (10 mM) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Phenol- und Chloroformextraktion wurde die Phagen DNA aus Ethanol gefällt und bei 4°C in Wasser gelöst aufbewahrt.

2.2. RNA Isolierung

2.2.1. Isolierung totaler zellulärer RNA :

0,5-1 g gefrorene Gewebestücke wurden in flüssigem N₂ in einem Stahlmörser pulverisiert und in 5-10 ml RNA-Extraktionspuffer (100 mM NaCl, 10 mM Natriumazetat pH 5,5, 0,5% SDS) aufgenommen. Nach Zugabe von 1 Vol mit Extraktionspuffer gesättigtem Phenol wurde die Suspension bei 50°C 3 min heftig geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation getrennt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt, die wässrige Phase anschliessend mit 1 Vol 4 M LiCl, 8 M Harnstoff versetzt und 24 h bei 0°C belassen.

Totale zelluläre RNA wurde durch Zentrifugation dieses Gemisches bei 20.000 rpm im SW41 Rotor (10°C, 30 min) gewonnen. Der Niederschlag wurde im 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,5% SDS aufgenommen, mit CHCl₃ extrahiert und zweimal mit Ethanol präzipitiert.

2.2.2 Anreicherung der poly-A⁺ Fraktion :

300 mg Oligo dT Zellulose wurde in 2 ml H₂O suspendiert und in eine 5 ml Plastikspritze gegossen, die am unteren Ende mit etwas Glaswolle verschlossen wurde. Die Säule wurde mit 5 ml 0,1 M NaOH, 15 ml H₂O und 5 ml Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,5 M NaCl, 0,1% SDS) gewaschen.

Totale zelluläre RNA (bis zu 3 mg) wurde in Puffer aufgenommen (Endkonzentration 200 µg/ml), 5 min auf 65°C erhitzt, in Eis abgekühlt und zweimal über die Säule gegeben. Anschliessend wurde die Säule in Puffer gewaschen bis keine Absorption bei 260 nm in der Waschlösung mehr detektierbar war. Die Säule wurde mit Elutionspuffer beschickt

(10 mM Tris/HCl pH 7,4, 0,1% SDS) und das Eluat in 0,5 ml Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen mit der höchsten Absorption bei 260 nm wurden vereinigt und die enthaltene polyadenylierte RNA mit Ethanol ausgefällt.

2.3. Verdau mit Restriktionsenzymen

In einem typischen Ansatz wurden 0,5-1,0 µg Lambda oder Plasmid DNA 2 µl 10xVerdauungspuffer (Maniatis, Fritsch, Sambrook, 1982) und die für eine vollständige Spaltung notwendige Menge an Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl gemischt. Der Verdau erfolgte 2-3 h bei 37°C.

2.4. Agarosegelelektrophorese

Mittels Elektrophorese durch Agarosegele können DNA Fragmente von 0,1-50 kb gut aufgetrennt werden.

Die in dieser Dissertation verwendeten Gele wurden zu 0,4-1,2% in TAE-Puffer hergestellt und enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid. Die Elektrophorese fand bei 40-50 Volt für 15 h oder bei 100 V für 5-6 h statt. Vor dem Auftragen wurde die DNA mit 0,1 Volumen Probenpuffer versetzt (20 mM EDTA, 10 mM Tris pH 7,5, 10% Glycerol 0,02% Bromophenolblau). In der Regel wurden 0,5-1 µg Plasmid - oder Phagen DNA bzw 20-35 µg genomische DNA aufgetragen. Die aufgrund des interkalierenden Ethidiumbromids bei kurzzeitigem UV-Licht fluoreszierenden DNA-Banden wurden durch einen Rotfilter mit Polaroid-Film photographiert.

Als Längenstandard wurde mit HindIII verdaute Lambda-DNA (Lambda-II, Fragmente: 23, 9,6, 6,6, 4,33, 2,25, 1,98, 0,56 und 0,14 kb) oder mit HindIII und EcoRI verdaute Lambda DNA (Lambda-III, Fragmente: 21,7, 5,15, 5,00, 4,37, 3,48, 1,98, 1,90, 1,59, 1,37, 0,94, 0,83, 0,56 und 0,14 kb) verwandt.

2.4.1. Gelelektrophorese von RNA :

20-40 µg totale zelluläre oder 2-10 µg polyadenylierte RNA wurde mit Ethanol gefällt und in 20-30 µl Denaturierungslösung aufgenommen, 15 min auf 65°C erhitzt und im Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1/5 Volumen Probenpuffer wurde auf 1,2%ige Agarosegele aufgetragen, die 2,2 M Formaldehyd enthielten. Die Elektrophorese fand bei 40 V für 15 h in NaH_2PO_4 pH 7,2 statt.

Lösungen :

Denaturierungspuffer 10x :

200 mM Hepes

50 mM NaOAc

10 mM EDTA

pH 7,0

Denaturierungslösung :

0,72 ml 10x Denaturierungspuffer

3,60 ml desionisiertes Formamid

1,17 ml 37% ige Formaldehydlösung

0,51 ml H_2O

6,00 ml

Probenpuffer :	1 ml NaH_2PO_4 200 mM pH 7,2
	5 ml Glycerol
	4 ml H_2O
	5 μl Bromophenolblau (1mg/ml)

2.4.2. Elektroelution von DNA Fragmenten :

Nach präparativer Agarosegelelektrophorese wurden DNA Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die Agarosestücke in einen Dialyseschlauch eingeführt. Nach Zupipettierung eines möglichst geringen Volumens TAE-Puffers wurde der Dialyseschlauch in eine Elektrophoresekammer eingelegt und die DNA durch Elektrophorese aus dem Gel eluiert. Zur weiteren Reinigung wurde die DNA in einer 5 cm Säule an DE52 Zellulose in TAE Puffer fixiert, mit HS Puffer (10 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA, 1 M NaCl) eluiert und mit Ethanol gefällt.

2.5. Nicktranslation

Ein Standardansatz enthielt in 50 μl :

500 mM Tris pH 7,5 100 mM MgCl_2	5 μl
1 mM dATP	2 μl
1 mM dGTP	2 μl
2% Rinderserumalbumin	2 μl
alpha- ^{32}P -dCTP (3000 Ci/mmol)	3 μl (30 μCi)
alpha- ^{32}P -dTTP (3000 Ci/mmol)	3 μl (30 μCi)
DNA (100 ng)	X μl
DNA Polymerase I	2.10 ⁶ E./l
DNAse I	3,1 $\mu\text{g/l}$
H_2O ad	50 μl

Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 14°C. Nach Zugabe von 1 ml 10% SDS und 1 ml 250 mM EDTA wurde das Gemisch über eine 15 cm Sephadex G-75 Säule gegeben um die nicht inkorporierten Nucleotide von der markierten DNA abzutrennen (Säulenpuffer : 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,1% SDS). Eine spezifische Aktivität von $3-8 \cdot 10^6$ cpm/ μ g DNA wurde routinemässig erreicht.

2.6. DNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierungsbedingungen ("Southern-Blot")

Das mit Ethidiumbromid behandelte Gel wurde unter UV-Licht zusammen mit einem Lineal photographiert. Das Gel wurde nacheinander mit folgenden Lösungen behandelt :

1 x 15 min	0,25 M HCl
2 x 30 min	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
2 x 45 min	0,5 M Tris pH 7,4 1,5 M NaCl

Die DNA wurde mit 20xSSC 6-18 h auf Nitrozellulose oder Nylonmembranen übertragen . Die Membranen wurden kurz in 2xSSC gewaschen und getrocknet. Die DNA wurde durch zweistündiges Backen bei 80°C auf Nitrozellulose, oder durch 5-minütige Behandlung bei UV-Licht auf Nylonmembranen fixiert.

Hybridisierungsbedingungen :

Die Membranen wurden in 75 μ l/cm² mindestens 2 h bei 42°C in

folgender Lösung vorhybridisiert :

50% Formamid

5xDenhardt'sche Lösung

5xSSC

100 µg/ml beschallte und hitzedenaturierte

Lachsspermien DNA

Zur Hybridisierung wurde 10% Dextransulfat und 1×10^6 cpm/ml nicktranslatierte DNA zugegeben und bei 42°C 16-18 h inkubiert. Anschliessend wurden die Membranen 2x10 min in 2xSSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 2 x 45 min bei 60-62°C in 0,1xSSC, 0,1% SDS gewaschen, getrocknet und bei - 70°C 1-6 Tage autoradiographiert.

2.7. RNA-Transfer auf Membranen und Hybridisierungsbedingungen ("Northern-Blot")

Analog zum oben beschriebenen Verfahren kann RNA aus Formaldehyd-Agarosegelen auf Membranen übertragen werden. Die Ethidiumbromidanfärbung und die Vorbehandlung des Gels entfallen. Als RNA Gel-Marker wurden eukaryontische 28S und 18S ribosomale RNA und prokaryontische 23S und 16S ribosomale RNA verwendet. Vorhybridisierung und Hybridisierung wurden wie beim "Southern-blot" beschrieben durchgeführt. Anschliessend wurden die Membranen 2x10 min in 2xSSC 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 3 x 15 min in 0,1xSSC 0,1% SDS bei 60°C gewaschen, getrocknet und bei 70°C 1-6 Tage autoradiographiert.

2.8. Entfernung der radioaktiv markierten DNA von Nylonmembranen

"Southern-Membranen" wurden zuerst 40 min in 0,4 M NaOH bei 45°C dann 40 min in 0,2 M Tris pH 7,4, 0,2xSSC bei 45°C inkubiert und anschliessend neu hybridisiert.

"Northern-Membranen" wurden vor erneuter Hybridisierung 5 min in Wasser gekocht.

2.9. Plaque Test nach Benton und Davis

Diese Methode erlaubt die Identifizierung von Phagen Plaques, die spezifische DNA Sequenzen enthalten. Aus Maniatis et al., 1982.

Phagen wurden auf Weichagaroseplatten ausplattiert, sodass die Plaques vereinzelt vorlagen. Die Platten wurden 1 h bei 4°C kaltgestellt, und anschliessend mit markierten Nitrozellulosefiltern belegt. Diese Markierung wurden mit einem Filzstift auf den Plattenboden übertragen. Nach erneutem Kaltstellen für 15 min wurden die Nitrozellulosefilter abgenommen, 2 min mit 1,5 M NaCl, 0,1 M NaOH denaturiert, 2 min mit 0,2 M Tris 2 mM EDTA neutralisiert, 2 min mit 2xSSC, 25 mM NaH₂PO₄ pH 7,2 gewaschen, getrocknet und 2 h bei 80°C gebacken. Die Filter wurden in folgender Lösung 2-4 h bei 68°C unter leichtem Schütteln vorhybridisiert :

2xDenhardt'sche Lösung

6xSSC

Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls bei 68°C für 16-18 h in 2-4 ml je Filter in :

1xDenhardt'sche Lösung
2xSSC
0,5% SDS
2 mM EDTA
25 mM NaH₂PO₄ pH 7,2
3-8x10⁵cpm/Filter hitzedenaturierte, radioaktiv
markierte DNA.

Die Filter wurden zweimal je 10 min bei Raumtemperatur mit 2xSSC, 0,1% SDS und viermal je 1 h bei 60°C in 0,8xSSC, 0,1% SDS gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

2.10. Konstruktion einer "Genbibliothek" in Lambda Phagen

2.10.1. Theorie :

Eine Kollektion von DNA Fragmenten bestimmter Länge, die die Gesamtheit eines haploiden Genoms ausmacht, wird mit dem Ausdruck "Genbibliothek" oder "Genbank" bezeichnet. Cosmid Bibliotheken enthalten DNA Fragmente von 35-40 kb, Lambda Phagen Bibliotheken Fragmente von 10-20 kb. Um eine wirklich repräsentative Genbank zu erstellen, müssen DNA-Fragmente hergestellt werden, die sich überlappen und statistisch gleichmässig über das gesamte Genom verteilen. Ein partieller Verdau der zellulären DNA mit dem Restriktionsenzym Sau3A, welches die Tetranukleotidsequenz GATC als Schnittstelle erkennt, kommt dieser Bedingung recht nahe : Bei einer Zusammensetzung der

DNA von 50% A/T und 50% G/C Paaren kommt eine beliebige Tetranukleotidsequenz alle 256 bp vor. Selbst bei einer Zusammensetzung von 80% G und C, käme die Schnittstelle GATC noch alle 625 bp vor. Die Sau3A Schnittstelle ist somit relativ unabhängig von der Basenzusammensetzung der DNA.

Die Kompatibilität des Enzyms Sau3A mit BamHI, welches die Schnittsequenz G/GATCC besitzt, erlaubt die Ligierung von Sau3A Fragmenten in Vektoren mit BamHI als Klonierungsschnittstelle. In drei von vier Fällen geht dabei die originäre BamHI Stelle verloren.

Wieviele unabhängige Klone einer Genbank müssen durchgetestet werden, um eine gegebene Sequenz eines Genoms wiederzufinden ? Diese Frage lässt sich durch die Anwendung folgender Beziehung beantworten :

$$N = \frac{\lg(1 - P)}{\lg(1 - L/G)}$$

wobei P die Wahrscheinlichkeit, L die mittlere Länge eines klonierten Fragmentes, G die Länge des Genoms und N die Anzahl der unabhängigen Klone darstellen : Um mit der Wahrscheinlichkeit P : 0,99 eine Sequenz eines höheren eukaryontischen Genoms (3×10^6 kb) in einer Phagen Genbank mit einer durchschnittlichen Länge der klonierten DNA-Fragmente von 15 kb zu finden, müssen demnach 860.000 Klone durchgetestet werden. Für die in dieser Dissertation beschriebene Klonierung wurde der Vektor Lambda L47.1 gewählt (wiedergegeben in Maniatis et al., 1982). Er besitzt zwei BamHI Schnittstellen, die ein internes "Stuffer" Fragment von 6,4 kb entfernen, und Sau3A Fragmente von 4,6-17,7 kb aufnehmen können. Die Phagenarme allein sind nicht in Phagenköpfe verpackbar, wohl aber die

mit fremder DNA rekombinierten Moleküle. Dieser Umstand erspart eine Unterscheidung zwischen restriktivem und permissivem Stamm. Alle auf E.coli LA 101 ausplattierten Phagen Plaques enthalten neu rekombinierte DNA Moleküle.

2.10.2. Präparation des Vektors Lambda L47.1 :

Die "cos" Enden des Phagen DNA werden zunächst mit sich selbst ligiert, um eine äquimolare Präparation der "Arme" zu erhalten. Nach Verdau mit BamHI wird das "Stuffer" Fragment mittels Zentrifugation durch einen Saccharosegradienten von den Phagenarmen abgetrennt.

Ligation :

200 µl	Phagen DNA (100 µg)
22 µl	10xLigase-Puffer
1 µl	T4 DNA Ligase (1 Einheit/µl)
223 µl	

Der Ansatz wurde 14 h bei 4°C belassen, dann die Ligase 10 min bei 70°C inaktiviert.

Restriktion :

223 µl	ligierte Phagen DNA
50 µl	40 mM Tris/HCl pH 7,9, 1,5 M NaCl, 60 mM MgCl ₂
203 µl	H ₂ O
12 µl	BamHI (10 Einheiten/µl)
12 µl	XhoI (10 Einheiten/µl)
500 µl	

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 16 h (XhoI schneidet noch einmal innerhalb des "Stuffer"-Fragments ; so entstehen zwei Fragmente von 5,5 und 0,9 kb, die leicht durch einen Saccharosegradient abtrennbar sind). Der Verdau wurde auf einem Gel auf seine Vollständigkeit hin überprüft, mit Phenol und CHCl_3 extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 100 μl TE-Puffer aufgenommen. In einem SW41 Polyallomer Zentrifugenröhrchen wurde ein Saccharosegradient von 5-40% in 10 mM Tris/HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1 M NaCl hergestellt und mit der DNA Lösung überschichtet. Nach Zentrifugation während 16 h bei 20°C und 30.000 rpm (SW41 Rotor) wurde der Gradient in 0,4 ml Fraktionen zerlegt. Ein Aliquot jeder dritten Fraktion wurde auf einem 0,8%igem Agarosegel getestet, die Fraktionen, die Phagenarme enthielten, vereinigt, mit TE-Puffer verdünnt und mit Ethanol präzipitiert.

2.10.3. Präparation der Sau3A-Fragmente :

Zunächst wurden in einem Test die Bedingungen ermittelt, um Fragmente zwischen 10 und 20 kb zu erhalten. Dazu wurde in Eppendorfreaktionsgefäßen bei 0°C eine Verdünnungsreihe von 10 Schritten angesetzt. Gefäße Nr. 2-10 enthielten in einem Gesamtvolumen von 10 μl , 1 μg genomische DNA, Gefäß Nr. 1 enthielt in 20 μl 2 μg DNA und 2 Einheiten Sau3A. Aus Gefäß Nr. 1 wurden 10 μl entnommen und in Gefäß Nr. 2 pipettiert, gemischt wieder 10 μl entnommen und in Gefäß Nr. 3 pipettiert. Die Verdünnungen wurden so bis Gefäß Nr. 10 fortgesetzt und 15 min bei 37°C inkubiert.

(10x Sau3A Puffer: 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 600 mM NaCl, 100 mM MgCl_2) Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 1 μl 250 mM EDTA gestoppt und auf einem 0,4%igen Agarosegel analysiert. Die Bedingungen,

die den höchsten Anteil an verdauter DNA zwischen 10 und 20 kb ergaben, wurden in einem 100 fachen, präparativen Ansatz eingesetzt. Die DNA wurde in einem Saccharosegradienten aufgetrennt, die Fraktionen zwischen 10 und 18 kb vereinigt, mit 1 Volumen TE-Puffer verdünnt und mit Ethanol präzipitiert.

2.10.4. Ligation :

Das molare Verhältnis zwischen Vektor und DNA-Insert ist 2:1, da ein "linker" und ein "rechter" Phagenarm benötigt werden, um ein Sau3A Fragment zu klonieren. Das Molekulargewicht des Vektors ist jedoch doppelt so gross ("linker" und "rechter Phagenarm" über "cos" Stelle ligiert = 30 kb), wie das des Inserts (15 kb), das Gewichtsverhältnis von Vektor zu Insert ist also 4:1. In der Praxis muss das genaue optimale Verhältnis jedoch empirisch ermittelt werden. Ein typischer Ligationsansatz enthielt in einem Endvolumen von 10 µl, 2-5 Einheiten T4 DNA Ligase, 300-350 ng Insert und 600-900 ng Vektor DNA. Die Ligierung fand bei 14°C für 48-72 h statt.

2.10.5. Verpackung und Ausplattieren :

Die E.coli Stämme BHB 2688 und BHB 2690 enthalten lysogene Lambda-Phagenen, die unter anderem jeweils einen Defekt im E bzw. D Kopfprotein haben. Die aus diesen Stämmen hergestellten Verpackungs-extrakte wurden von der Firma Amersham bezogen. Eine Vermischung beider Extrakte mit Lambda DNA wurde nach den Bedingungen des Herstellers durchgeführt, mit Phagenpuffer auf 500 µl aufgefüllt und mit 25 µl CHCl₃ versetzt. Zur Titration des Phagenmisches wurden

Verdünnungen mit Bakterien (8 h Kultur von E.coli LA 101) vermischt, 10-15 min bei 37°C inkubiert und auf TB-Platten ausplattiert. Folgende Titer wurden festgestellt :

Wildtyp Lambda-DNA :	5-8x10 ⁷ pfu/μg
"Phagen Arme" L47.1:	1-8x10 ³ pfu/μg
Ligation von "Phagen Armen" und Insert :	0,5-1x10 ⁶ pfu/μg

Eine Genbank von 2x10⁶pfu, aus totaler DNA eines hepatozellulären Karzinoms des Woodchucks W64 wurde auf 240 Platten (Ø 10cm) in einer Dichte von ca. 8300 pfu/Platte ausplattiert. Die Bank wurde mit radioaktivmarkierter DNA als Sonde (z.B. WHV-DNA, c-myc 2. und 3. Exon) durchgetestet (siehe Plaque Test nach Benton und Davis). Positive Klone wurden mit einer Pasteur Pipette ausgestanzt, in 500 μl Phagenpuffer aufgenommen und noch zwei- bis dreimal neu ausplattiert und hybridisiert. Die so gereinigten Phagenplaques wurden wie folgt auf einen Titer von 10⁸-10⁹pfu/ml amplifiziert. Auf einer zuvor mit 1 ml Phagenpuffer befeuchteten TB-Platte wurden 200 μl eines ausgestanzten Klons ausplattiert und 16 h bei 37°C inkubiert. Der Weichagar wurde abgekratzt, mit 1 ml Phagenpuffer und 300 μl CHCl₃ versetzt und kräftig geschüttelt (Vortex, 3 min). Die Suspension wurde abzentrifugiert und der Überstand titriert. Wenn nötig, wurde die Prozedur mit dem jeweils neu gewonnenen Überstand so lange wiederholt, bis der gewünschte Titer erreicht war.

2.11. Klonierung in Plasmiden

2.11.1. Ligierung :

DNA Fragmente und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 2:1 vermischt, mit 1/10 Volumen 10xLigase Puffer und mit 2-5 Einheiten T4 DNA Ligase 16 h bei 4°C ligiert.

2.11.2. Transformation von E.coli :

Zur Aufnahme von DNA wurden Bakterien (E.coli DH1, TG1) in 100 ml LB-Medium bis $OD_{600} = 0,7$ bei 37°C gezogen, 30 min auf Eis stehengelassen und abzentrifugiert (Sorvall, 5000 rpm, 10 min). Der Zellniederschlag wurde in 50 ml eiskaltem $CaCl_2$ (50 mM) aufgenommen und erneut für 30 min auf Eis gestellt, dann abzentrifugiert und in 6,5 ml eiskaltem 50 mM $CaCl_2$ aufgenommen.

Zur Transformation wurden 200 µl Bakteriensuspension mit 1-10 µl DNA Lösung (20-100 ng) versetzt und 40 min im Eisbad stehengelassen. Nach Inkubation für 3 min bei 42°C wurde 800 µl LB-Medium zugegeben und das Gemisch 1 h bei 37°C belassen. Aliquots von 50-200 µl wurden auf antibiotikahaltigen Platten ausplattiert. In der Regel wurden ca. 10^5 Kolonien je µg DNA erhalten.

"Screening" der Kolonien :

Ca. 200 Kolonien wurden mit Holzstäbchen gleichzeitig auf eine normale Antibiotikaplatte und eine Platte mit Nitrozellulosefilter übertragen. Zur Lyse der Kolonien wurde der bewachsene Filter 7 min auf einen Tropfen (2 ml) 0,5 M NaOH gelegt (Kolonien nach oben), getrocknet und für weitere 10 min auf 2 ml 0,1 NNaOH, 1,5 M NaCl gelegt. Der Filter wurde dann wie beim Plaque Test nach Benton und Davis beschrieben weiterbehandelt.

2.12. Sequenzierung von DNA Fragmenten

DNA Sequenzierung wurde nach der Kettenverlängerungs-Methode von Sanger et al. (1977) durchgeführt. DNA Fragmente wurden entweder direkt oder in einem Schrotschuss Verfahren (Deininger, 1983) in die M13 Phagenvektoren M13 mp8, M13 tg 130 (Messing et al., 1982) subkloniert. Die Anhybridisierung eines Standardprimers (17-mer) direkt neben der Klonierungstelle, an die Einzelstrang-DNA eines rekombinanten M13 Phagen, erlaubte die Durchführung der Kettenverlängerungsreaktionen mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA Polymerase I. Durch Inkorporation eines radioaktiv markierten Deoxynukleosidtriphosphates (α -(^{35}S)-dATP) konnten die Polymeraseprodukte nach Auftrennung auf einem Polyacrylamidgel auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden.

2.12.1. Klonierung in M13 mp8 :

Die zu klonierende DNA wurde durch Beschallen (3x5 sec., 20 Watt) in Fragmente zwischen 0,100 und 1 kb zerlegt, mit Ethanol präzipitiert und in 10 μl H_2O aufgenommen. 5' überhängende Enden wurden dann wie folgt zu "flush" Enden aufgefüllt :

10	μl	beschallte DNA (10-50 μg)
2	μl	500 mM Tris pH 7,4
		100 mM MgCl_2 (klenow-Reaktionspuffer)
2	μl	"Chase" Lösung (siehe unten)
2	μl	Klenow-Polymerase (1 Einh./ μl)
4	μl	H_2O
20	μl	

Dieses Gemisch wurde 2 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf einem 1%igen Agarosegel mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid aufgetrennt.

Aus dem "DNA-Schmier" wurde der Bereich zwischen 300 und 900 bp ausgeschnitten, die DNA elektroeluiert und über eine 5 cm DEAE-Zellulose Säule gereinigt. (Als DNA Längenmarker wurde mit HaeIII verdauter Φ x174 DNA verwendet). Die eluierten DNA Fragmente wurden mit SmaI verdautem und dephosphoryliertem Vektor M13 mp8 (Bedingungen siehe 2.12) ligiert.

Nach Transformation von E.coli TG1 wurde die Bakteriensuspension zusammen mit 200 µl frischen Indikatorbakterien, 40 µl 100 mM IPTG und 40 µl 2% X-gal (in DMF) auf T-Platten ausplattiert.

M13 mp8 enthält ein intaktes β -Galaktosidasegen, das durch die Klonierung funktionsunfähig wird. Da β -Galaktosidase die Verbindung X-gal spalten und damit den blauen Farbstoff Bromochloroindol freisetzen kann erscheinen M13 Wildtypplaques blau auf T-Platten, während M13 Rekombinanten farblos bleiben.

Wenn nur das zu sequenzierende DNA Fragment beschallt und subkloniert wurde, konnten die farblosen Plaques direkt gepickt und weiterverarbeitet werden. Wurde in Plasmid- oder Phagenvektoren rekombinierte DNA eingesetzt, so mussten die Plaques noch einmal nach der Benton und Davis Methode mit einer entsprechenden Sonde durchgetestet werden.

2.12.2. Präparation von Einzelstrang M13 Phagen DNA :

100 ml 2xYT Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur von E.coli TG1 versetzt. 1,5 ml Aliquots dieser Kultur wurden mit je einem isolierten M13 Phagenplaque angeimpft und 5 h bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden durch zweimaliges Zentrifugieren abgetrennt und die

Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 200 µl 20% Polyethylenglykol 6000, 2,5 M NaCl präzipitiert (15min Raumtemperatur). Der Phagenniederschlag wurde sorgfältig von Polyethylenglykolresten befreit, in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und mit Phenol extrahiert. Die Einzelstrang DNA wurde aus dem wässrigen Überstand mit Ethanol ansgefällt, mit Ethanol gewaschen, getrocknet in 40 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C aufbewahrt.

2.12.3. "Annealing" des Standard Primers und "Sanger"-Reaktionen :

Die Gemische aus Dideoxy- und Deoxynukleotiden wurden für jede Base (T, C, G, A) wie folgt hergestellt :

Mix	T	C	G	A
dTTP (0,5 mM)	5	100	100	100
dCTP	100	5	100	100
dGTP	100	100	5	100
ddTTP (10 mM)	15			
ddCTP (10 mM)		3		
ddGTP (10 mM)			5	
ddATP (5 mM)				1-3
Tris/HCl pH 8,0 (25 mM)	200	200	200	100

Angaben in µl.

"Chase"-Lösung :	dTTP (20 mM)	5 µl
	dCTP (20 mM)	5 µl
	dGTP (20 mM)	5 µl
	dATP (20 mM)	5 µl
	H ₂ O	80 µl
		100 µl

Ansatz für "Annealing" :	5 µl	Einzelstrang M13 DNA
	1 µl	Primer (17-mer, 2 ng)
	1,5 µl	Klenow Reaktionspuffer
	2,5 µl	H ₂ O
	10 µl	

Dieses Gemisch ("Annealing") wurde 10 min auf 70°C erhitzt und dann für 1 h in dem sich abkühlenden Wasserbad belassen.

Zur Sequenzierung je eines Klonen wurden vier Eppendorfgefäße vorbereitet und nach folgenden Schema beschickt :

Gefäße :	T	G	C	A
"Annealing" Ansatz	2,5	2,5	2,5	2,5
Mix T	2			
Mix G		2		
Mix C			2	
Mix A				2
Reaktionsmischung	2	2	2	2
	20 min, Raumtemperatur			
"Chase" Lösung	2	2	2	2
	20 min, Raumtemperatur			
Probenpuffer	2	2	2	2
	1 h 80°C			

Angaben in µl.

Reaktionsmischung pro Klon :

1,25 µl	alpha-(³² P)-dATP
6 µl	H ₂ O
1 µl	Klenow Polymerase
8,25 µl	

Probenpuffer :	100 ml	deionisiertes Formamid
	0,03 g	Bromophenolblau
	0,03 g	Xylencyanol
	0,75 g	Na ₂ EDTA. 2H ₂ O (20 mM)

Um ein TBE Gradientengel der Abmessungen 50 cm x 20 cm x 0,04 cm herzustellen wurde wie folgt verfahren :

Zu 6 ml der Lösung B wurden 12 µl TEMED und 12 µl APS pipettiert, zu 32 ml von Lösung A je 90 µl TEMED und APS. In einer 25 ml Glaspipette wurden zunächst 6 ml der Lösung A aufgesogen, dann 6 ml der Lösung B. Beide wurden durch Passieren von Luftblasen leicht vermischt und zwischen zwei Gelplatten gegossen. Der Rest von Lösung A wurde nachgegossen und ein Kamm mit 30-35 Zähnen zwischen die Plattenenden gesteckt. Das Gel wurde über Nacht bei Raumtemperatur zur Polymerisierung belassen.

2.12.4. Sequenzanalyse :

Die Sequenzen der einzelnen Klone wurden in einen Computer eingegeben und mittels Programmen geordnet und analysiert, die von Roger Staden (MRC, Cambridge) für die Sangersche Dideoxysequenziermethode geschrieben worden waren. Alle Computeranalysen dieser Dissertation wurden im Rechenzentrum des Institut Pasteur, Paris, durchgeführt :

- Eingabe der Sequenzen mit dem Programm BATIN
- Konstruktion einer Datenbank mit dem Programmen DBSTART und DBAUTO
- Manipulation der Sequenz mit dem Programm DBUTILN.

3. ALS PROBEN VERWENDETE DNA FRAGMENTE

WHV Genom : 3,3 kb Insert des Plasmids pBH20-WHV-1 (Geschenk von Dr.W.Ogston)

β -Actin : 1,1 kb c-DNA Insert, humane Sequenz. (Geschenk von Dr. S. Alonso)

1. c-myc Exon: 1,4 kb BglIII Fragment aus DNA des Phagen Nr. 11/3, subkloniert in pGEM-1, Woodchuck Sequenz.

2. und 3. c-myc Exon : 1,5 kb SacI und 1,6 kb ClaI Fragmente, gereinigt aus dem Plasmid pKH47, humane Sequenz (Geschenk von Dr. D. Stehelin).

F. ANHANG

Die im Ergebnisteil beschriebene Aktivierung des c-myc Gens durch Rearrangement 5' der kodierenden Region ist typisch für viele B- und T-Zell Neoplasmen und für Plasma Zell Tumoren der Maus. Die Gewebeproben W93, W64 wurden deshalb einer histologischen Analyse unterworfen (Material von W74 war nicht mehr verfügbar), die von Dr. M. Hadchouel, Institut Pasteur, durchgeführt wurde. Im Lichtmikroskop betrachtete Gefrierschnitte zeigten die typischen Strukturen eines hepatozellulären Karzinoms, der Nichttumorteil zeigte die Architektur normalen Lebergewebes. Vereinzelt vorkommende Lymphozyten und Megakaryozyten wurden im HCC und im Nichttumorteil beobachtet. Wären die c-myc Rekombinationen diesen Lymphozyten zuzuschreiben, hätten zusätzliche DNA Fragmente in der Southern Analyse der DNA aus W64 und W93 Gewebeproben sowohl im Tumor als auch im Nichttumorteil erscheinen müssen, und wären von schwächerer Intensität gewesen.

Eine Southern Analyse von DNA aus W64 und W93 Milzgewebe zeigte nur die zu erwartenden, normalen c-myc DNA-Fragmente (nicht gezeigt). Eine weitere Hybridisierung dieser Southern Membran mit einer WHV-Probe zeigte keine integrierten, viralen Sequenzen, wie sie in W64 und W93 HCC beobachtet wurden.

Virale Integration und c-myc Rearrangement sind daher Ereignisse, die sich in Hepatozyten vor oder während des Transformationsprozesses abgespielt haben müssen. Die Existenz eines B- oder prä B- Zell Tumors, der diese Ergebnisse vorgetäuscht haben könnte, ist auszuschliessen.

G. ABKÜRZUNGEN

ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
cpm	Impulse pro Minute
dNTP	2'-Dideoxynucleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2'-3'-Dideoxynukleosid-5'-triphosphat
DNase	Deoxyribonuklease
DMF	Dimethylformamid
<u>E.coli</u>	<u>Escherichia coli</u>
EDTA	Ethylendiamintetraazetat
HBV	Hepatitis B Virus
h	Stunde
kb	Kilobasen
kD	Kilo Dalton
LTR	"long terminal repeat"
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
min	Minuten
O.D.	Optische Dichte
pfu	plaque forming units
poly-A	polyadenylat
³² p	radioaktives Isotop von Phosphor
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

^{35}S

Radioaktives Isotop von Schwefel

Tris

Trishydroxymethylaminomethan

H. LITERATUR

- Adams, J.M., Harris, A.W., Pinkert, C.A., Corcoran, L.M., Alexander, W.S., Cory, S., Palmiter, R.D. & Brinster, R.L. (1985) : The c-myc oncogene driven by immunoglobulin enhancer induces lymphoid malignancy in transgenic mice. *Nature*, 318, 533-538.
- Alitalo, K., Ramsay, G., Bishop, J.M., Ohlsson, S., Colby, W.W., McGrath, J.P. & Levinson, A.D. (1983) : Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature*, 306, 274-277.
- Ar-Rushdi, A., Nishikura, K., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G. & Croce, C.M. (1983) : Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science*, 222, 390-393.
- Beasley, R.P. & Hwang, L. (1984) : Epidemiology of hepatocellular carcinoma in "Viral Hepatitis and Liver Disease" (Vyas G.N. ed.) New-York : Grune & Stratton, 209-224.
- Bernard, O., Cory, S., Gerondakis, S., Webb, E. & Adams, J.M. (1983): Sequence of the murine and human cellular myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B-lymphoid tumors. *EMBO J.*, 2, 2375-2383.
- Bishop, J.M. (1985) : Viral oncogenes. *Cell*, 42, 23-38.
- Bishop, J.M. (1987) : Molecular genetics of cancer. *Science*, 235, 305-311.
- Bréchet, C., Pourcel, C., Louise, A., Rain, B. & Tiollais, P. (1980) : Presence of integrated hepatitis B virus DNA sequences in cellular DNA of human hepatocellular carcinoma. *Nature*, 286, 533-535.

- Bréchet, C. (1987) : Hepatitis B virus (HBV) and hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.*, 4, 269-279.
- Cattaneo, R., Will, H. & Schaller, H. (1984) : Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J.*, 3, 2191-2196.
- Chakraborty, P.R., Ruiz-Opazo, N., Shouval, D. & Shafritz, D.A. (1980) : Identification of hepatitis B virus DNA and expression of viral RNA in an HBsAg-producing human hepatocellular carcinoma cell line. *Nature*, 286, 531-533.
- Coll, J., Righi, M., de Taisne, C., Dissous, C., Gegonne, A. & Stehelin, D. (1983) : Molecular cloning of the avian acute transforming retrovirus MH2 reveals a novel cell-derived sequence (v-mil) in addition to the myc oncogene. *EMBO J.*, 12, 2189-2194.
- Dane, D.S., Cameron, C.H. & Briggs, M. (1970) : Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, II, 695-697.
- Deininger, P.L. (1983) : Random subcloning of sonicated DNA: application to shotgun DNA sequence analysis. *Anal. Biochem.*, 129, 216-223.
- Dejean, A., Sonigo, P., Wain-Hobson, S. & Tiollais, P. (1984) : Specific hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA through a viral 11-basepair repeat. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 81, 5350-5354.
- Dejean, A., Bréchet, C., Tiollais, P. & Wain-Hobson, S. (1983) : Characterization of integrated hepatitis B viral DNA Cloned from a human hepatoma and the hepatoma derived cell line PLC/PRF/5. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 80, 2505-2509.
- Dunnick, W., Baumgartner, J., Fradkin, L., Schultz, C. & Szurek, P.

- (1985) : Methylation of plasmacytoma c-myc genes. *Gene*, 39, 287-292.
- Edman, J.C., Gray, P., Valenzuela, P., Rall, B. & Rutter, W.J. (1980) : Integration of hepatitis B virus sequences and their expression in a human hepatoma cell. *Nature*, 286, 535-538.
 - Eick, D., Piechaczyk, M., Henglein, B., Blanchard, J.M., Traub, B., Kofler, E., Wiest, S., Lenoir, G.M. & Bornkamm, G.W. (1985) : Aberrant c-myc RNAs of Burkitt's lymphoma cells have longer half lives. *EMBO J.*, 4, 3717-3725.
 - Freytag von Loringhoven, A., Koch, S., Hofschneider, P.H. & Koshy, R. (1985) : Co-transcribed 3' host sequences augment expression of integrated hepatitis B virus DNA. *EMBO J.*, 4, 249-255.
 - Gazin, C., de Dinechin, D., Hampe, A., Masson, J.H., Martin, B., Stehelin, D. & Galibert, F. (1984) : Nucleotide sequence of the human c-myc locus : provocative open reading frame in the first exon. *EMBO J.*, 3, 383-387.
 - Gough, N. (1983) : Core and e antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNA. *J. Molec. Biol.*, 165, 683-699.
 - Klein, G. & Klein, E. (1985) : Evolution of tumors and the impact of molecular oncology. *Nature*, 315, 190-195.
 - Koshy, R., Koch, S., Freytag von Loringhoven, A., Kahmann, R., Murray, K. & Hofschneider, P.H. (1983) : Integration of hepatitis B virus DNA: Evidence for integration in the single stranded gap. *Cell*, 34, 215-223.
 - Lachmann, H.M. & Skoultchi, A.J. (1984) : Expression of c-myc

changes during differentiation in mouse erythroleukemia cells. *Nature*, 310, 592-594.

- Land, H., Parada, L.F. & Weinberg, R. (1983) : Tumorigenic conversion of primary embryofibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, 304, 569-602.
- Leder, P., Battey, J., Lenoir, G., Moulding, C., Murphy, W., Potter, H., Stewart, T. & Taub, R. (1983) : Translocations among antibody genes in human cancer. *Science*, 222, 765-771.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. (1982) : "Molecular cloning, a laboratory manual", Cold Spring Harbor, New York.
- Makino, R., Hayashi, K. & Sugimura, T. (1984) : c-myc transcript is induced in rat liver at a very early stage of regeneration or by cycloheximid treatment. *Nature*, 310, 697-698.
- Marion, P.L., Oshiro, L.S., Regnery, D.C., Scullard, G.H. & Robinson, W.S. (1980) : A virus in beechey ground squirrel that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 77, 2941-2945.
- Mason, W.S., Seal, G. & Summers, J. (1980) : Virus of pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.*, 35, 829-836.
- Messing, J. & Vieira, J. (1982) : A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double digested restriction fragments. *GENE*, 19, 269-276.
- Nepveu, A. & Marcu, K. (1986) : Intragenic pausing and anti-sense transcription within the murine c-myc locus. *EMBO J.*, 5, 2859-2865.
- Nishikura, K., Ar-Rushdi, A., Erikson, J., Watt, R., Rovera, G. & Croce, C.M. (1983) : Differential expression of the normal and translocated human c-myc oncogene in B-cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

(USA), 80, 4822-4826.

- Nusse, R. (1986) : The activation of cellular oncogenes by retroviral insertion. *Trends Genet.*, 2, 244-247.
- Ochiya, T., Fujiyama, A., Fukushima, S., Hatada, I. & Matsubara, K. (1986) : Molecular cloning of an oncogene from a human hepatocellular carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 83, 4993-4997.
- Ogston, C.W., Jonak, G.J., Rogler, C.E., Astrin, S.M. & Summers, J. (1982) : Cloning and structural analysis of integrated woodchuck hepatitis virus sequences from hepatocellular carcinoma of woodchucks. *Cell*, 29, 358-394.
- Ou, I.M. & Rutter, W. (1985) : Hybrid hepatitis B virus - host transcripts in a human hepatoma cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82, 83-87.
- Payne, G.S., Bishop, J.M. & Varmus, H. (1982) : Multiple arrangements of viral DNA and an activated host oncogene in bursal lymphomas. *Nature*, 295, 209-214.
- Piccoli, S.P., Caimi, P. & Cole, M.B. (1984) : A conserved sequence at c-myc oncogene chromosomal translocation breakpoints in plasmacytomas. *Nature*, 310, 327-330.
- Pourcel, C., Louise, A., Gervais, M., Chenciner, N., Dubois, M.F. & Tiollais, P. (1982) : Transcription of the hepatitis B surface antigen in mouse cells transformed with cloned viral DNA. *J. Virol.*, 42, 100-105.
- Popper, H., Roth, L., Purcell, R.H., Tennant, B.C. & Gerin, J.L. (1987) : Hepatocarcinogenicity of the woodchuck hepatitis virus. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. (USA), 84, 866-870.
- Ray, D., Meneceur, P., Tavitian, A. & Robert-Lezenes, J. (1987) : Presence of a c-myc transcript initiated in intron 1 in Friend erythroleukemia cells and in other murine cell types with no evidence of rearrangement. *Mol. Cell. Biol.*, 7, 940-945.
 - Remmers, E.F., Yang, J.Q. & Marcu, K.B. (1986) : A negative transcriptional control element located upstream of the murine c-myc gene. *EMBO J.*, 5, 899-904.
 - Robinson, W.S., Marion, P., Feitelson, M. & Siddiqui, A. (1981) : The hepadna virus group : Hepatitis B and related viruses. In "Viral Hepatitis", (Szmuness, W., Alter, H.J. & Maynard, J.E., eds.), 57-68, Franklin Institute Press, Philadelphia.
 - Rogler, C.E. & Summers, J. (1982) : Novel forms of woodchuck hepatitis virus DNA isolated from chronically infected liver nuclei. *J. Virol.*, 44, 852-863.
 - Rogler, C.E., Hino, O. & Su, C.Y. (1987) : Molecular aspects of persistent woodchuck hepatitis virus and hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 7, 74S-78S.
 - Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, N.S. (1977) : DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 74, 5463-5467.
 - Seeger, C., Ganem, D. & Varmus, H. (1986) : Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy, *Science*, 232, 477-484.
 - Sinn, E., Muller, W., Pattengale, P., Tepler, J., Wallau, R. & Leder, P. (1987) : Coexpression of MMTV v-Ha-ras and MMTV c-myc genes in transgenic mice : synergistic action of oncogenes in vivo. *Cell*, 49,

465-475.

- Shafritz, D.A., Shouval, D., Howard, I.S., Hadziyannis, S.J. & Kew, M.C. (1981) : Integration of hepatitis B virus DNA into the genome of liver cells in chronic liver disease and hepatocellular carcinoma. *New Engl. J. Med.*, 305, 1067-1073.
- Shen-Ong, G.L., Keath, E.J., Piccoli, S.P. & Cole, M.D. (1982) : Novel myc oncogene mRNA from abortive immunoglobulin gene recombination in mouse plasmacytomas. *Cell*, 31, 443-452.
- Stanton, L.W., Watt, R. & Marcu, K. (1983) : Translocation, breakage and truncated transcripts of the c-myc oncogene in murine plasmacytomas. *Nature*, 303, 401-406.
- Summers, J., Smolec, J. & Snyder, R. (1978) : A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 75, 4533-4537.
- Summers, J. & Mason, W.S. (1982) : Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcriptase of an RNA intermediate. *Cell*, 29, 403-415.
- Taub, P., Moulding, G., Battey, J., Murphy, W., Vasiak, T., Lenoir, G. & Leder, P (1984) : Activation and somatic mutation of the translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma cells. *Cell*, 36, 339-348.
- Tiollais, P., Pourcel, C. & Dejean, A. (1985) : The hepatitis B virus, *Nature*, 317, 489-495.
- Tonegawa, S. (1983) : Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302, 575-581.
- Tsujimoto, Y., Gorham, J., Cossman, J., Jaffee, E. & Croce, C.M. (1985) : The t (14;18) chromosome translocation involved in B-cell

neoplasms result from mistakes in V-D-J joining. *Science*, 229, 1390-1393.

- Weinberg, R. (1985) : The action of oncogenes in the cytoplasm and the nucleus. *Science*, 230, 770-776.
- Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R. & Schaller, H. (1987) : Replication strategy of human hepatitis B virus. *J. Virol.*, 61, 904-911.
- Yaginuma, K., Kobayashi, M., Yoshida, E. & Koike, K. (1985) : Hepatitis B virus integration in hepatocellular carcinoma DNA : Duplication of cellular flanking sequences at the integration site. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 82, 4458-4462.
- Yang, J.Q., Bauer, S., Mushinske, J.F. & Marcu, K.B. (1985) : Chromosome translocations clustered 5' of the murine c-myc gene qualitatively affect promotor usage : implications for the site of normal c-myc regulation. *EMBO J.*, 4, 1441-1447.
- Ziener, M., Garcia, P., Shaul, Y. & Rutter, W. (1985) : Sequence of hepatitis B virus DNA incorporated into the genome of a human hepatoma cell line . *J. Virol.*, 53, 885-892.
- Zimmermann, K.A., Yancopoulos, G.D., Collum, R.G., Smith, R.K., Kohl, N.E., Denis, K.A., Nau, M.M., Witte, O., Toran-Allerand, D., Gee, C.E., Minna, J.D. & Alt, F.W. (1986) : Differential expression of myc family genes during murine development. *Nature*, 319, 780-783.

I. LEBENSLAUF

Name :	Möröy
Vorname :	Tarik
Geboren :	4. Mai 1959 in Benediktbeuern/Obb.
Staatsangehörigkeit :	deutsch
Ausbildung :	
Mai 1977	Abitur, Theodor-Heuss-Gymnasium, Heilbronn
Okt 1978	Aufnahme des Studiums der Biochemie an der Universität Tübingen
März 1981	Abschluss des Vordiploms, Fächer: Physik, Zoologie, Botanik, Anatomie, anorg., org., physikal. und physiologische Chemie.
Aug 1983	Theoretischer Teil der Diplomprüfung in organischer Chemie, physiologischer Chemie und Mikrobiologie.
Sep 1983 - Mai 1984	Diplomarbeit in der Abteilung von Prof. Dr. P.Overath am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen (Untersuchungen zur Konformation des bakteriellen Membranproteins Laktose Permease mit anti-Peptid Antikörpern)
seit Juni 1984	Doktorarbeit unter der Betreuung von Prof.Dr. P.H.Hofschneider, Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried. Durchführung des experimentellen Teils in der Abteilung von Prof.Dr.P.Tiollais am Institut Pasteur in Paris. (Untersuchungen zur Rolle von Hepatitis B Virus bei der Entstehung primärer Leberkarzinome).
Wehrdienst :	
Juli 1977 - Sep 1978	15 - monatiger Grundwehrdienst.

